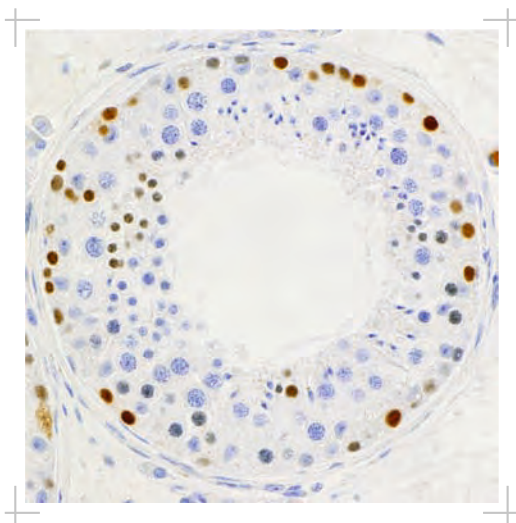


# Evaluation von Markern zur Klassifizierung und Quantifizierung von Spermatogenesestadien bei Ratte, Maus und Mensch

---

Mareike Hanna Maria Borgers



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

**Evaluation von Markern  
zur Klassifizierung und Quantifizierung  
von Spermatogenesestadien bei Ratte,  
Maus und Mensch**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Mareike Hanna Maria Borgers  
aus Nürnberg

Gießen 2014

Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe,  
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen,  
Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. Hans-Rudolf Tinneberg

1. Gutachter: PD Dr. rer. nat. Lutz Konrad
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Klaus Steger

Tag der Disputation: 22.04.2015

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Histologie des Hodens und Anordnung im Keimepithel .....	1
1.2	Mitose und Meiose als Voraussetzungen der sexuellen Fortpflanzung .....	2
1.3	Samenzellbildung zur Erzeugung einer neuen Generation.....	3
1.3.1	Spermatogoniennomenklatur bei Menschen und Nagetieren .....	5
1.3.2	Morphologie der Spermatogonientypen.....	6
1.3.3	Charakteristika von Spermatozyten und Spermatiden .....	9
1.3.4	Die Stammzellnische .....	12
1.4	Infertilität und pathologische Veränderungen im humanen Hoden .....	13
1.5	Score-Count-Evaluation zur Klassifikation von Spermatogenesedefekten.....	13
1.6	Ziel der Arbeit .....	15
<b>2</b>	<b>Material und Methode .....</b>	<b>16</b>
2.1	Material .....	16
2.1.1	Gewebeproben.....	16
2.1.2	Puffer und Chemikalien .....	17
2.1.3	Antikörper.....	18
2.1.3.1	Verwendete Primärantikörper.....	18
2.1.3.2	Getestete Primärantikörper .....	19
2.1.3.3	Sekundärantikörper .....	20
2.1.4	Geräte, Computerprogramme und sonstige Materialien .....	20
2.2	Methode.....	21
2.2.1	Paraffinschnitte .....	21
2.2.2	Immunhistochemie .....	22
2.2.2.1	Erläuterung der Methode.....	22
2.2.2.2	Immunhistochemisches Protokoll .....	23
2.2.2.3	Kontrollen in der Immunhistochemie .....	25
2.2.3	Auswertung und Dokumentation .....	25
2.2.4	Statistische Analyse .....	27
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>29</b>
3.1	Deskriptive Analyse der Expressionsmuster .....	29
3.1.1	Keimzellproteine in der frühen Spermatogenese oder Spermiogenese .....	30
3.1.1.1	SPOC1 als spermatogonialer Marker .....	30
3.1.1.2	GILZ als Marker für Spermatogonien und Spermatozyten.....	32
3.1.1.3	MYBL1 als Proteinmarker der ersten Reifeteilung der Meiose.....	34

3.1.1.4 ACE als Marker für elongierte Spermatiden und Spermatozoen.....	36
3.1.2 Wiederkehrende Proteinexpression in der Spermatogenese .....	38
3.1.2.1 H2AK5ac als Marker von Spermatogonien und der späten Spermiogenese .....	38
3.1.2.2 $\gamma$ H2A.X als Meiose-Marker in der Spermatogenese .....	41
3.2 Evaluation der Expressionsmuster in verschiedenen Spezies.....	45
3.3 Serienuntersuchung mit humanem Gewebe .....	47
3.3.1 OCT2, ein Marker früher Spermatogonien.....	47
3.3.2 SAGE1 als Marker für sich differenzierende Spermatogonien und den Mitose-Meiose-Übergang .....	48
3.3.3 SMAD3 als Marker für Spermatozyten in der Meiose .....	50
3.3.4 Auswertung der Serienuntersuchung mit NSP-, HYP- und SZA-Patienten	52
3.3.4.1 Quantifizierung der frühen bis mittleren Phase der Keimzellentwicklung und Vergleich der Patientengruppen .....	52
3.3.4.2 Festlegung der Grenzwerte .....	55
3.3.4.3 Einteilung der Spermatogenesedefekte.....	56
3.3.4.4 Individuelle Patientenanalyse .....	59
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>60</b>
4.1 Lokalisation der untersuchten Proteine in Keimzellen von Ratte, Maus und Mensch .....	60
4.1.1 SPOC1 in undifferenzierten und differenzierten Spermatogonien.....	60
4.1.2 GILZ als prämeiotisches Protein .....	61
4.1.3 MYBL1 und dessen Funktion in der Meiose .....	62
4.1.4 ACE in der Spermiogenese .....	63
4.1.5 Acetylierung von Kernhistonen.....	64
4.1.6 $\gamma$ H2A.X als Indikator von Doppelstrangbrüchen und XY-Inaktivierung.....	65
4.2 Proteinexpression im Speziesvergleich .....	67
4.3 Serienuntersuchung mit OCT2, SAGE1 und SMAD3 .....	68
4.3.1 OCT2 als Marker für undifferenzierte Spermatogonien.....	68
4.3.2 SAGE1 in mitotischen, differenzierenden Spermatogonien und frühen Spermatozyten .....	69
4.3.3 SMAD3 in pachytänen Spermatozyten .....	70
4.3.4 Interpretation der Quantifikation .....	71
4.3.5 Analyse der Spermatogenesedefizite .....	73
4.3.5.1 Prämeiotische Defizite.....	73
4.3.5.2 Ineffiziente Spermatogenese wegen dysfunktionaler Sertoli-Zellen....	74

4.3.5.3 Kompensationsmechanismen von Defiziten bei NSP und HYP .....	74
4.3.6 Nutzen des neuen Klassifikationssystems.....	75
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>76</b>
<b>6 Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>78</b>
<b>7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>81</b>
<b>8 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>84</b>
<b>9 Publikationsverzeichnis .....</b>	<b>93</b>
<b>10 Ehrenwörtliche Erklärung .....</b>	<b>94</b>
<b>11 Danksagung .....</b>	<b>95</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Histologie des Hodens und Anordnung im Keimepithel

Der Hoden wird von einer Bindegewebskapsel (Tunica albuginea) umgeben, die glatte Muskelzellen enthält. Ausgehend von der Kapsel ziehen Septen in den Hoden und unterteilen diesen in Hodenläppchen (Lobuli testis). Jedes der Läppchen beinhaltet Hodenkanälchen (Tubuli seminiferi contorti), die stark geknäult und von einer Lamina propria, bestehend aus einer Basalmembran und Myofibroblasten (Peritubulärzellen), umgeben sind (Lüllmann-Rauch, 2006). Die Kanälchen besitzen ein Lumen und sind von Keimepithel ausgekleidet, welches aus somatischen Zellen (Sertoli-Zellen) und Keimzellen gebildet wird (Bergmann, 2005). Die Sertoli-Zellen fungieren dabei als Stützzellen, indem sie mit ihren verzweigten, bis zum Lumen reichenden Fortsätzen ein Gerüst für die Keimzellen bieten. Sie erzeugen ein spezielles Milieu für die Keimzellentwicklung und übertragen entwicklungsrelevante Stimuli (Bergmann, 2005). Des Weiteren bilden sie mittels Tight junctions die Blut-Hoden-Schranke aus, die das Keimepithel in ein basales und ein adluminales Kompartiment unterteilt (Holstein et al., 2003). Die Sertoli-Zellen lassen sich aufgrund des charakteristischen, polymorphen Zellkerns mit deutlichem Nukleolus gut identifizieren (Clermont, 1963). Durch die Verbindung zum Rete testis, das sich in die Ductuli efferentes fortsetzt, gelangen die Spermien mittels peristaltischen Kontraktionen der Tubuli passiv in den Nebenhoden (Bergmann, 2005). Das interstitielle Kompartiment zwischen den Lobuli seminiferi beinhaltet Blut- und Lymphgefäße, androgenbildende Leydig-Zellen, Nerven, lockeres Bindegewebe und Zellen des Immunsystems (Weinbauer et al. 2009).

Im Keimepithel (s. Abbildung 1.1) liegen die Spermatogonien am Rand der Tubuli an der Basalmembran und wandern mit zunehmender Reifung, von Spermatozyten zu runden und schließlich zu elongierten Spermatiden, lumenwärts. Dabei bleiben die aus einer Zelle entstandenen Zellklone über Interzellularbrücken miteinander verbunden, wodurch eine synchrone Keimzellreifung ermöglicht wird (Bergmann, 2005). Die elongierten Spermatiden sind kopfüber in den apikalen Buchten der Sertoli-Zellen verankert und werden als Spermatozoen ins Tubuluslumen freigelassen. Übrig gebliebene Teile des Zytoplasmas bleiben als Residualkörperchen zurück und werden von den Sertoli-Zellen phagozytiert (Lüllmann-Rauch, 2006). Ein Tubulusquerschnitt bildet somit eine Momentaufnahme des zyklischen Entwicklungsprozesses ab, in der gleichzeitig Keimzellen unterschiedlicher Reife vorhanden sind. Für den humanen Hoden identifizierte Clermont (1963) sechs Stadien mit spezifischer Zellzusammensetzung des Keimepithels. Für die Maus wurden zwölf und für die Ratte 14 Stadien klassifiziert (Leblond & Clermont, 1952; Oakberg, 1956). Im Nagetierhoden ist in einem Tubulusquerschnitt meistens nur ein



Spermatogenesestadium sichtbar (Ehmcke et al., 2006). Im Gegensatz dazu sind im Querschnitt der humanen Hodentubuli mehrere Stadien gleichzeitig vorhanden (Ehmcke et al., 2006; Cerilli et al., 2010). Von den Stadien abzugrenzen ist der Begriff „Step“, der verwendet wird, um die verschiedenen Differenzierungsstufen der Spermio-genese (s. Kapitel 1.3) zu benennen (Sibony et al., 1994).

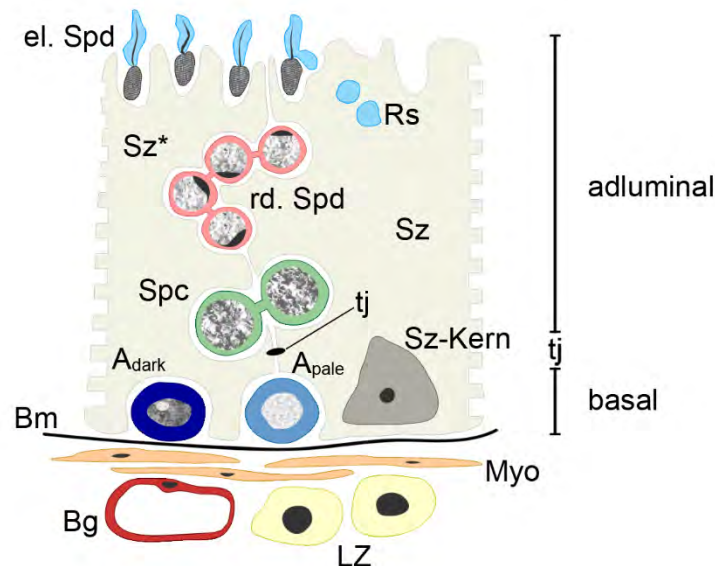


Abbildung 1.1: Ausschnitt aus dem Keimepithel. Die Trennung des basalen vom adluminalen Kompartiment erfolgt durch die von Sertoli-Zellen (Sz und Sz\*) gebildeten Tight junctions (tj). Die Spermatogonien-Subtypen A<sub>dark</sub> und A<sub>pale</sub> befinden sich im basalen Kompartiment nahe der Basalmembran (Bm). Die durch Reifeteilung entstehenden Spermatozyten (Spc) und runden Spermatozoen (rd. Spd) sind durch Zytoplasmabrücken miteinander verbunden und wandern nach adluminal. Die elongierten Spermatozoen (el. Spd) reichen mit ihren Schwänzen ins Lumen und geben überschüssiges Zytoplasma als Residualkörper (Rs) ab, das von den Sertoli-Zellen phagozytiert wird. Weiter abgebildet ist ein Sertoli-Zellkern (Sz-Kern) und das die Tubuli umgebende Gewebe, bestehend aus Blutgefäßen (Bg), Leydig-Zellen (LZ) und peritubulären Myofibroblasten (Myo). Die Abbildung ist modifiziert aus Lüllmann-Rauch (2006).

## 1.2 Mitose und Meiose als Voraussetzungen der sexuellen Fortpflanzung

Zur Gewebsvermehrung (Proliferation) wird die Mutterzelle in der Mitose durch symmetrische Verteilung der zuvor verdoppelten DNA in zwei identische Tochterzellen geteilt (Lüllmann-Rauch, 2006). Dafür durchlaufen die Zellen im eukaryoten Organismus einen Zyklus aus Interphase und M-Phase (Mitose). Die längere Interphase dient der Verdopplung der DNA in jedem Chromosom (S-Phase) sowie der Prüfung des genetischen Materials auf Fehler (G-Phasen), um diese gegebenenfalls zu reparieren (Lüllmann-Rauch, 2006). In der kürzeren M-Phase, in der die Chromosomen kondensiert vorliegen und somit sichtbar sind, werden die Chromatiden unter Ausbildung einer Mitosespindel in den Abschnitten Prophase, (Pro-)Metaphase, Anaphase, Telophase und Zytokinese auf

zwei Tochterzellen verteilt (Drenckhahn, 2008). Ob die Zelle weitere Zyklen durchläuft, entscheidet sich am Restriktionspunkt durch den Einfluss von Wachstumsfaktoren. Alternativ kann sich die Zelle in den  $G_0$ -Zustand begeben und unter dem Einfluss von verschiedenen Faktoren eine Differenzierung durchlaufen oder durch Apoptose untergehen (Lüllmann-Rauch, 2006).

Für die geschlechtliche Fortpflanzung werden in der Meiose Keimzellen mit haploidem Chromosomensatz hervorgebracht. So kann sich durch Vereinigung von Gameten (Eizellen und Spermatozoen) eine diploide, befruchtete Eizelle (Zygote) bilden, aus der ein neues Lebewesen entsteht (Drenckhahn, 2008). Die beiden Reifeteilungen der Meiose sind ebenfalls in Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase gegliedert, wobei sich die Prophase I weiter unterteilen lässt in Prä-/Leptotän, Zygotän, Pachytän, Diplotän und Diakinese. Nach prämeiotischer Verdopplung der DNA findet in der langandauernden ersten Reifeteilung eine Paarung der homologen Chromosomen, ein Austausch von DNA-Stücken zwischen Chromatiden (Crossing-over) und die Trennung der homologen Chromosomen statt (Lüllmann-Rauch, 2006). So entstehen zwei Zellen mit einfachem Chromosomensatz mit jeweils zwei Chromatiden pro Chromosom. In der zweiten sehr kurzen Reifeteilung gehen durch die Trennung der Schwesterchromatiden vier Zellen mit haploidem Chromosomensatz und einer Chromatide pro Chromosom hervor (Lüllmann-Rauch, 2006).

### 1.3 Samenzellbildung zur Erzeugung einer neuen Generation

Während der Spermatogenese entstehen aus Spermatogonien morphologisch voll differenzierte Spermatiden. Es werden vier Phasen der Keimzellreifung unterschieden (Bergmann, 2005; Weinbauer et al. 2009):

1. Mitotische Proliferation und Differenzierung der Spermatogonien
2. Meiotische Reifeteilung der Spermatozyten
3. Transformation der runden Spermatiden zu Spermatozoen (Spermiogenese)
4. Freisetzung der Spermatiden aus dem Keimepithel in das tubuläre Lumen (Spermiation)

Durch Proliferation und Differenzierung gehen aus Spermatogonien die primären Spermatozyten (Spc I) hervor. Die Bezeichnung der Spc I richtet sich nach den Meiosestadien. Mit den (prä-)leptotänen Spermatozyten (pl-Spc), die ihre DNA prämeiotisch verdoppeln, tritt die Zelle in die langandauernde Prophase der Meiose ein. Im Leptotän (leptotäne Spermatozyten, l-Spc) beginnt die Kondensation der Chromosomen und es kommt für die folgende Rekombination zu Doppelstrangbrüchen in den Chromatiden. In den zygotänen Spermatozyten (z-Spc) paaren sich die homologen Chromosomen

(Lüllmann-Rauch, 2006). Am Übergang zum Pachytän paaren sich auch die Geschlechtschromosomen, die mit der Kernmembran verbunden bleiben und so das Sex-Vesikel bilden (Holstein, 2008). Im Pachytän (pachytäne Spermatozyten, p-Spc) werden die DNA-Doppelstrangbrüche repariert und es schließt sich ein Austausch homologer Chromatiden-Segmente an. In den diplotänen Spermatozyten (di-Spc) wird diese Rekombination durch die sich verbindenden benachbarten Chromatiden (Chiasma) deutlich (Lüllmann-Rauch, 2006). Mit der Diakinese (Di) löst sich die Kernhülle auf und es folgt die Separierung der Chromosomen in der Meta-, Ana- und Telophase mit Bildung von zwei sekundären Spermatozyten (Spc II). Nach einer kurzen Interphase ohne DNA-Reduplikation gehen aus den zwei Spc II, die in histologischen Präparaten aufgrund der kurzen Verweildauer nur selten zu finden sind, in der zweiten Reifeteilung vier runde Spermatiden (rd. Spd) hervor (Lüllmann-Rauch, 2006). Die Vorgänge sind vereinfacht in Abbildung 1.2 dargestellt. Die Spermatiden erfahren durch Kernkondensierung, Spermienkopf-, Akrosom- und Schwanzbildung (Geißel) eine Differenzierung zu elongierten Spermatiden (el. Spd; Bergmann, 2005). Der Golgi-Apparat bildet dafür zunächst ein akrosomales Bläschen aus, aus dem sich im Verlauf die akrosomale Kappe entwickelt. Diese liegt der Kernoberfläche an und enthält das Enzym Akrosin, das für das Eindringen des Spermatozoons in die Eizelle von Bedeutung ist (Bergmann, 2005). Durch Freisetzung in das Tubuluslumen werden aus den elongierten Spermatiden Spermatozoen (Spz), die morphologisch bereits voll differenziert, jedoch noch funktionell unreif sind (Lüllmann-Rauch, 2006). Ihre Eigenbeweglichkeit erlangen die Spermatozoen erst während der Nebenhodenpassage (Russell et al., 1990).

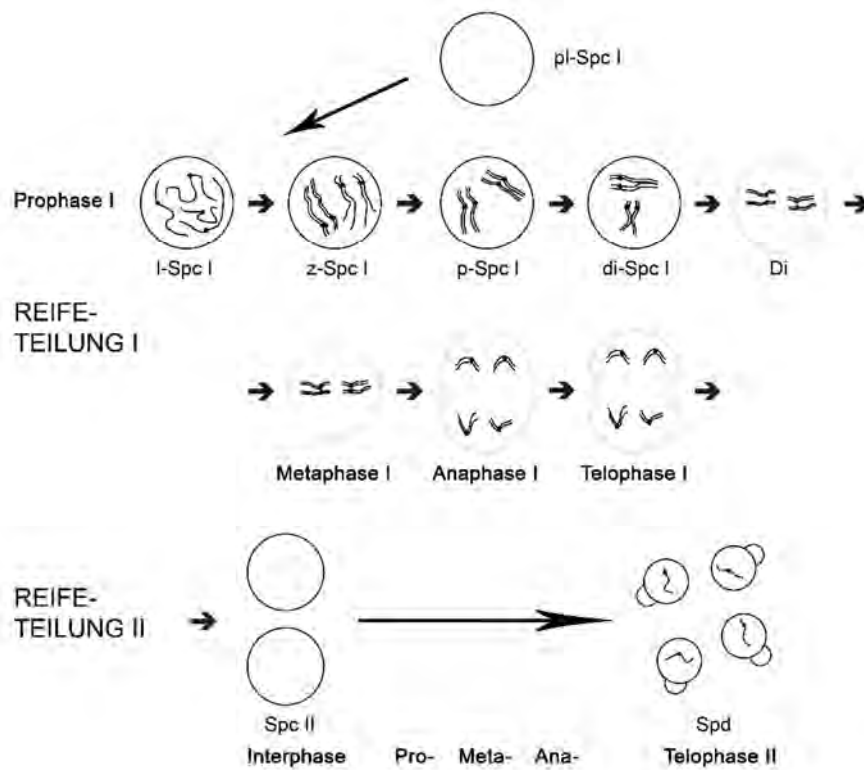


Abbildung 1.2: Darstellung der meiotischen ersten und zweiten Reifeteilung. Abgebildet sind nur die Vorgänge im Zellkern, ohne Mitosespindel oder Zytoplasmabrücken. Der (prä-)leptotäne Spermatozyt (pl-Spc I), der die DNA prämeiotisch dupliziert, durchläuft in der Prophase I der ersten Reifeteilung die Erscheinungsform des leptotänen (I-Spc I), zygotänen (z-Spc I), pachytänen (p-Spc I), diplotänen (di-Spc I) und Diakinese-Spermatozyten (Di). In der Diakinese löst sich die Kernhülle auf (blass dargestellte Kernhülle) und es entstehen nach Meta-, Ana- und Telophase-I sekundäre Spermatozyten (Spc II). Aus diesen entwickeln sich sehr schnell in der zweiten Reifeteilung vier runde Spermatozoen (Spd), die akrosomale Bläschen ausbilden. Die Abbildung ist modifiziert aus Holstein, (2008).

### 1.3.1 Spermatogonienomenklatur bei Menschen und Nagetieren

Im menschlichen Hoden konnten anhand der unterschiedlichen Zellkerne drei Spermatoγονientypen klassifiziert werden:  $A_{\text{dark}}$ ,  $A_{\text{pale}}$  und B, deren Morphologie in Kapitel 1.3.2 beschrieben wird. Bisher ist nicht vollständig geklärt, welche Zellen spermatogonialen Stammzellcharakter besitzen. Clermont (1972) beschrieb, dass es sich bei  $A_{\text{dark}}$  um Reservestammzellen und bei  $A_{\text{pale}}$  um Stammzellen handeln könnte, die sich einerseits selbsterneuern aber auch zur Produktion von Spermatozyten beitragen. Ehmcke et al. (2006) verwendeten zur Beschreibung der  $A_{\text{pale}}$  den Begriff der Progenitorzellen, die sich durch eine hohe mitotische Aktivität auszeichnen und weiterdifferenzieren können, gleichzeitig aber auch eine funktionelle Reserve darstellen. Weiterhin konnten Hermann

et al. (2010) eine Heterogenität der  $A_{\text{pale}}$  bei Primaten feststellen, da diese Zellen in unterschiedlicher Ausprägung bekannte Proteinmuster undifferenzierter Zellen exprimieren. Es wird schließlich vermutet, dass spermatogoniale Stammzellen eine Subpopulation der  $A_{\text{dark}}$  und/oder der  $A_{\text{pale}}$  sind (Dym et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit wird daher nicht von einer strikten Trennung der spermatogonialen Stammzellen ausgegangen, sondern sowohl die  $A_{\text{dark}}$ - als auch die  $A_{\text{pale}}$  Subtypen als undifferenzierte Zellen mit Stammzellcharakter beschrieben.

Die Nomenklatur der Spermatogonien von Nagetieren unterscheidet sich von der des Menschen. Aus der Nagetierkeimzelle  $A_{\text{single}}$  ( $A_s$ ) entstehen mittels Teilung zwei Zellen, die  $A_{\text{paired}}$  ( $A_{\text{pr}}$ ) und diese bleiben, wie alle folgenden Klone, durch eine interzelluläre Zytoplasmabrücke miteinander verbunden.  $A_{\text{pr}}$  proliferieren weiter zu Ketten aus vier, acht, 16 und manchmal 32  $A_{\text{aligned-Spg}}$  ( $A_{\text{al}}$ ). Ohne weitere Mitose differenzieren  $A_{\text{al}}$  zu einem bestimmten Zeitpunkt der Spermatogenese zu  $A_1$ -Spg (s. Kapitel 1.3.2). Diese teilen sich weiter zu  $A_2$ -,  $A_3$ -,  $A_4$ -, In- und schließlich B-Spg, die dann in die erste Prophase der Meiose eintreten.  $A_s$ - $A_{\text{al}}$  stellen dabei die undifferenzierten und  $A_1$ -B die differenzierenden Keimzellen dar (Huckins, 1971; Oakberg, 1971; de Rooij, 1998).

Unter den genannten Zellen gelten  $A_s$  als die einzigen Keimzellen im Nagetierhoden, die die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen und dabei gleichzeitig die regenerative und die funktionelle Reserve darstellen (Ehmcke et al., 2006). Es ist jedoch nicht vollständig geklärt, wie die Selbsterneuerung erfolgt. Es wird angenommen, dass es symmetrische Teilungen gibt, die in zwei neuen  $A_s$  oder einer  $A_{\text{pr}}$  münden (De Rooij & Russell, 2000). Ob auch asymmetrische Teilungen vorkommen, bei denen gleichzeitig  $A_s$  und Vorläuferzellen entstehen (Li & Xie, 2005), ist nicht gesichert. Des Weiteren wurde beschrieben, dass bei einer Dysfunktion der eigentlichen Stammzellpopulation möglicherweise auch den durch Interzellulärbrücken verbundenen undifferenzierten Spermatogonien Stammeigenschaften zugeschrieben werden können, diese also potenzielle Stammzellen sein könnten (Nakagawa et al., 2007; De Rooij, & Griswold, 2012). Da eine Bestätigung der zuletzt genannten These nicht vorliegt, werden in dieser Arbeit nur die  $A_s$  als spermatogoniale Stammzellen bezeichnet.

### 1.3.2 Morphologie der Spermatogonientypen

Aus den Beschreibungen von Clermont (1963) und Von Kopylow et al. (2012b) geht hervor, dass die humanen  $A_{\text{dark}}$  einen ovalen Zellkern besitzen, der durch anfärbbares Chromatin dunkel erscheint und häufig einen oder mehrere runde nichtgefärbte Anteile hat, die sogenannten Rarefaction Zonen (Verdünnungszonen). Die Funktion dieser Zo-

nen ist bisher unbekannt, sie sind jedoch hilfreich bei der Identifikation der  $A_{\text{dark}}$ . Hingegen weisen  $A_{\text{pale}}$  helle, ovalrunde Zellkerne auf, die eine inhomogenere Chromatinverteilung als die  $A_{\text{dark}}$  und häufig zwei Nucleoli am Zellkernrand aufweisen. Spermatogonien der Entwicklungsstufe B sind durch einen granulierten, runden Zellkern mit großen, dunklen Chromatinflecken entlang der Kernhülle zu erkennen. Abbildung 1.3 zeigt diese Zelltypen schematisch.

Eine Charakterisierung der Spermatogonien von Nagetieren nahmen Chiarini-Garcia & Russell (2001) sowie Chiarini-Garcia et al. (2003) vor. Sie beschreiben  $A_s$ ,  $A_{\text{pr}}$  und  $A_{\text{al}}$  als Zellen mit ovalem Zellkern, der aufgrund der Chromatinverteilung fleckig und dunkel imponiert. Der Zellkern von  $A_1$  erscheint dagegen durch eine sehr feine Granulierung hell, so dass sich hier ein deutlicher Kontrast zum dunklen Nukleolus abzeichnet. Mit zunehmender Proliferation von  $A_2$  zu  $A_4$  wird der Zellkern runder und durch dichteres Chromatin wieder etwas dunkler. Ein zusätzliches Kennzeichen ist, dass Chromatin die Kernhülle dieser Spermatogonien säumt, ausgehend von <10% in  $A_2$  bis zu 70% in  $A_4$ . Die Kerne der Intermediär (In)-Spg sind zu 70-100% perlenschnurartig von Chromatin ausgekleidet. In B-Spg lagert sich das Chromatin in dunklen, runden Klümpchen zusammen, die 50-70% der Kernhülle säumen. Die beschriebene Charakteristik der Keimzellkerne wurde in die schematische Abbildung 1.4 integriert.

Für die Identifikation der Keimzelltypen im Nagetierhoden ist es neben der morphologischen Differenzierung hilfreich, die jeweiligen Tubulusstadien der Querschnitte zu bestimmen, da die frühen Keimzellen insgesamt sehr ähnlich sind (Chiarini-Garcia & Russell, 2001). In Abbildung 1.6 und 1.7 (s. Kapitel 1.3.3) sind die verschiedenen Stadien des Keimepithels dargestellt. Während  $A_s$ - $A_{\text{al}}$  in allen Stadien der Spermatogenese vorhanden sind (De Rooij & Russell, 2000; Aponte et al., 2005), liegt für die weiteren Entwicklungsstufen ein typisches, stadienspezifisches Verteilungsmuster vor. Besonders hervorgehoben wird in der Literatur der Übergang von  $A_{\text{al}}$  zu  $A_1$  im Stadium VII bis VIII, der ohne weitere mitotische Teilung erfolgt (De Rooij & Russell, 2000; Chiarini-Garcia & Russell, 2001). Diese Transition bedeutet einen Wandel in der Keimzellentwicklung, da ab diesem Zeitpunkt ein kontrollierter Entwicklungsplan bis zu den Spermatozoen abläuft (De Rooij & Grootegoed, 1998). Des Weiteren zeichnet sich das Stadium IV-V dadurch aus, dass elongierte Spermatiden mit ihren Köpfen tief in das Keimepithel wandern, bevor sie wieder in Richtung Lumen transportiert werden. Die Funktion dieser Translokation ist nicht bekannt, jedoch für die Identifikation der Stadien hilfreich (Vogl et al., 2000). Bei der Identifikation von Zelltypen im Nagetierhoden muss schließlich beachtet werden, dass vollständig zusammenhängende Zellklone aufgrund deren longitudinaler Anordnung meist nur in Tubulustotalpräparaten und nicht in Tubulusquerschnitten gesehen werden können (Phillips et al., 2010).

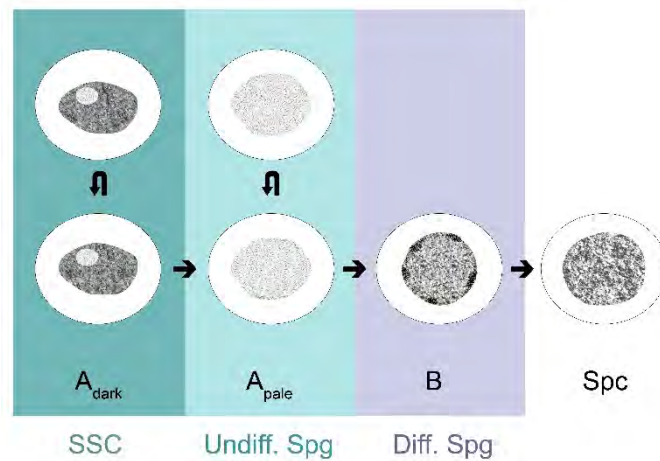


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Spermatogonientypen und eines primären Spermatozyten des Menschen. Sowohl  $A_{\text{dark}}$  als auch  $A_{\text{pale}}$  sollen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen.  $A_{\text{dark}}$  - B: Spermatogonientypen, Spc: Spermatozyt, SSC: spermatogoniale Stammzelle, Undiff. Spg: Undifferenzierte Spermatogonien, Diff. Spg: Differenzierte Spermatogonien. Die Abbildung ist modifiziert nach Ehmcke et al. (2006).

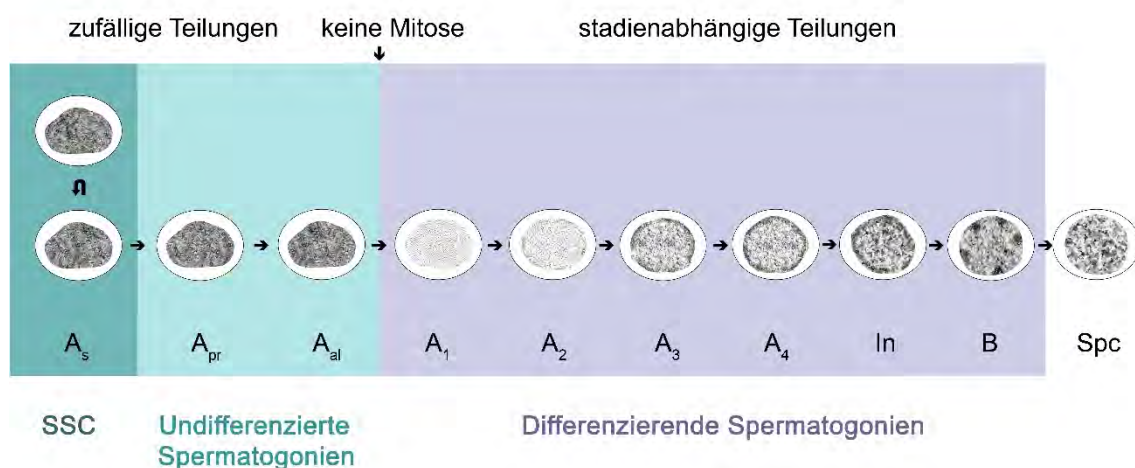


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Spermatogonientypen und eines Spermatozyten bei Ratten und Mäusen.  $A_s$  wird die Fähigkeit zur Selbsterneuerung zugeschrieben.  $A_s$  - B: Spermatogonientypen, Spc: Spermatozyt, SSC: spermatogoniale Stammzelle. Modifizierte Abbildung nach Ehmcke et al. (2006).

### 1.3.3 Charakteristika von Spermatozyten und Spermatiden

Die Morphologie der weiteren Keimzellentwicklungsstufen ist bei Menschen und Nagetieren sehr ähnlich. Es gilt jedoch zu beachten, dass eine unterschiedliche Stadienanzahl vorliegt (s. Abbildung 1.5 – 1.7). Die Spermatogonien Typ B, die sich von der Tubuluswand lösen, (Bergmann, 2005) entwickeln sich weiter zu (prä-)leptotänen Spermatozyten.

Aus den Beschreibungen von Clermont (1963), Rowley & Heller (1971) und Russell et al. (1990) geht hervor, dass (prä-)leptotäne Spermatozyten den B-Spg sehr ähnlich, jedoch etwas kleiner sind. Sie beschreiben, dass die weiteren Entwicklungsstadien primärer Spermatozyten mit zunehmender Reifung größer werden und der Kern durch die Chromosomenkondensation fein gefleckt erscheint. Die sekundären Spermatozyten ähneln den frühen runden Spermatiden, da beide Zelltypen runde Zellkerne mit wenig Chromatin aufweisen. Im weiteren Verlauf der Differenzierung sind die runden Spermatiden durch das sich am Zellkernrand bildende akrosomale Bläschen, aus dem die akrosomale Kappe hervorgeht, identifizierbar. Im Anschluss nehmen der Zellkern und das Zytoplasma eine längliche Form an (Elongation), so dass der Kopf- und der Schwanzteil der Spermatiden entstehen. Der Schwanz befindet sich dabei auf der Gegenseite des Akrosoms. Bei Nagetierspermatiden verformt sich der Kopf zudem hakenartig (s. Abbildung 1.6 – 1.7). Überschüssiges Zytoplasma wird als Residualkörperchen abgeschnürt. Danach verlässt die Zelle als Spermatozoon das Keimepithel.



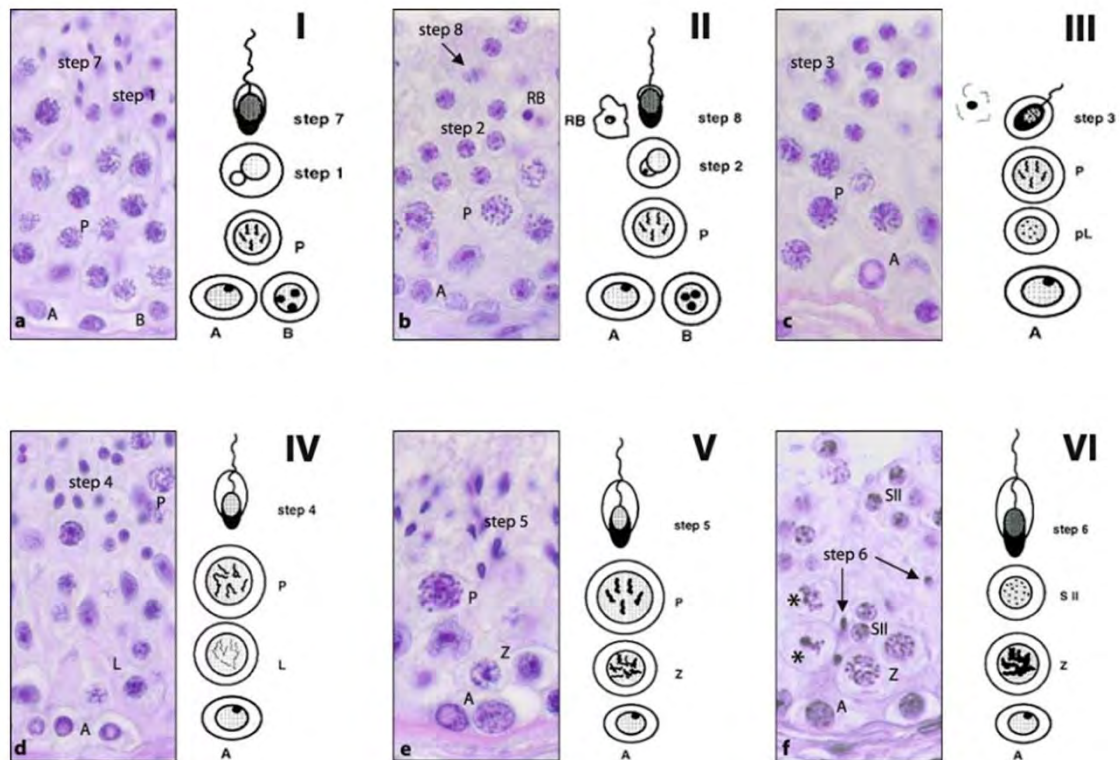


Abbildung 1.5: Spermatogenesestadien beim Mann. a – f: Stadium I-VI. A, B: A- und B-Spg, L: leptotäne Spermatozyten (Spc), Z: zygotäne Spc, P: pachytäne Spc, S II: sekundäre Spc, Step1–8: verschiedene Steps der Spermiogenese, RB: Residualkörperchen, \*: Zellen in der ersten Reifeteilung. Die Abbildung wurde entnommen aus Bergmann & Kliesch (2009).

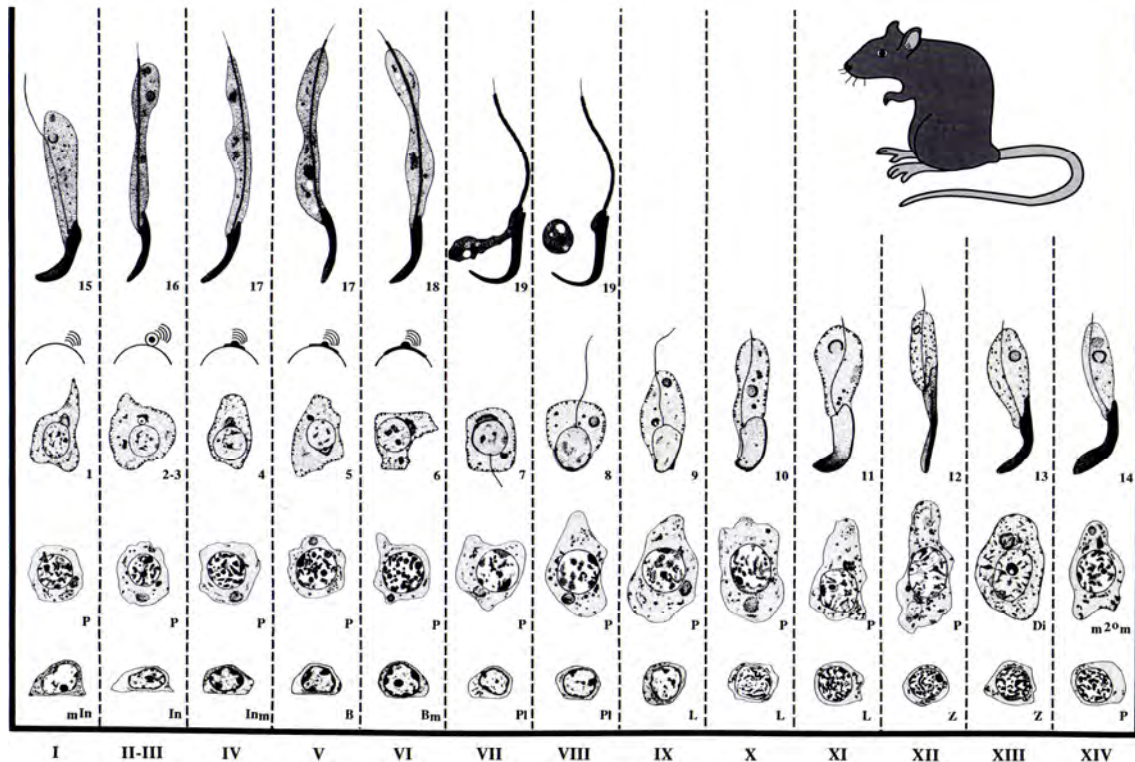


Abbildung 1.6: Spermatogenesestadien bei der Ratte. Darstellung der Stadien I-XIV. In: Intermediäre Spg, B: B-Spg, Pl: (prä-)leptotäne Spermatozyten (Spc), L: leptotäne Spc, Z: zygotäne Spc, P: pachytäne Spc, D: Diakinese, m<sup>2°</sup>m: sekundäre Spc, 1–19: Spermiogenesesteps. Die Abbildung wurde entnommen aus Knobil & Neill (2006).

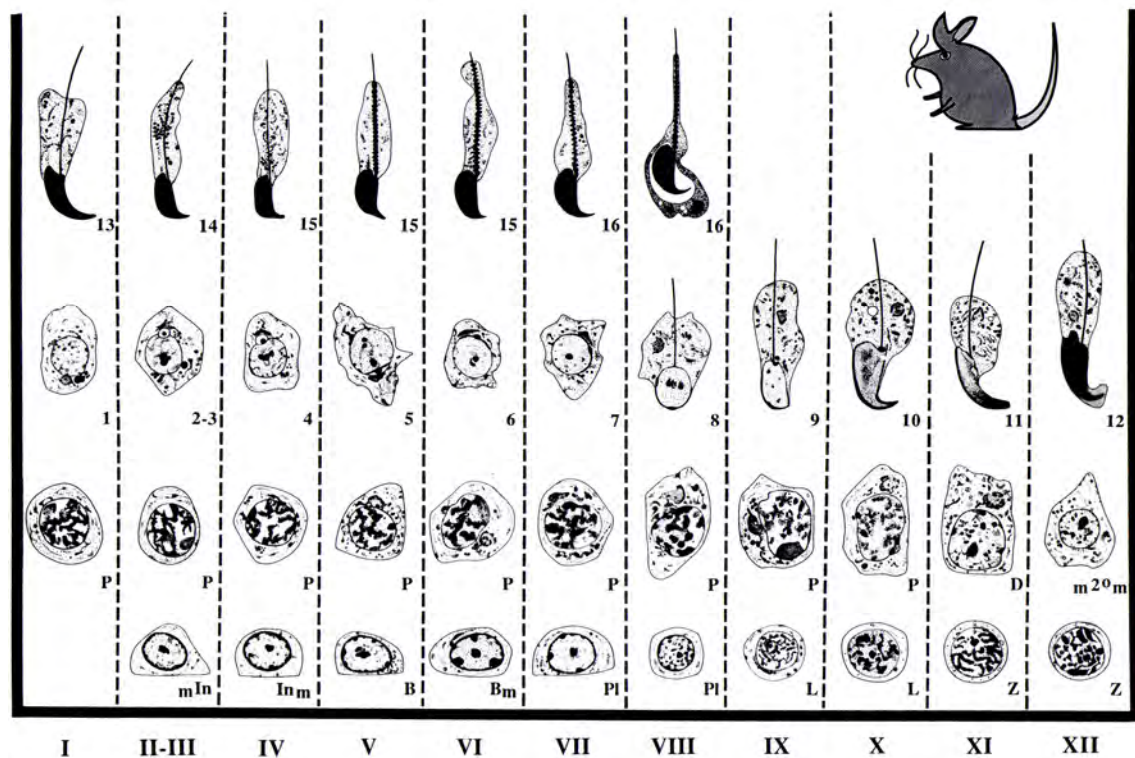


Abbildung 1.7: Spermatogenesestadien bei der Maus. Darstellung der Stadien I-XII. In: Intermediäre Spg, B: B-Spg, Pl: (prä-)leptotäne Spc, L: leptotäne Spc, Z: zygotäne Spc, P: pachytäne Spc, D: Diakinese, m<sup>2°</sup>m: sekundäre Spc, 1–16: Spermiogenesesteps. Die Abbildung wurde entnommen aus Russell et al. (1990).

### 1.3.4 Die Stammzellnische

Bei der Analyse von Hodenbiopsien adulter Ratten und Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Verteilung der Keimzellen innerhalb der Tubuliquerschnitte nicht zufällig ist. Vorzugsweise  $A_s$ ,  $A_{pr}$  und  $A_{al}$  sind dort zu finden, wo die Basallamina direkten Kontakt zum Interstitium hat (Chiarini-Garcia et al., 2001, 2003). Diese Bereiche werden als Nischen bezeichnet, die durch ein spezifisches Mikromilieu charakterisiert und durch die umgebenden Leydig-Zellen und Blutgefäße beeinflusst werden (Shetty & Meistrich, 2007; Yoshida et al., 2007). Ebenso sollen auch Sertoli-Zellen und Peritubulärzellen zum Selbsterneuerungsprozess der Keimzellen in den Nischen beitragen (Dadoune, 2007; de Rooij, 2009; s. Abbildung 1.8). Das Verhalten der Keimzellen in den Nischen wird folglich durch extrinsische Stimuli und die intrinsische Genexpression reguliert (Li & Xie, 2005; Oatley & Brinster, 2008). Keimzellen, die sich differenzieren, sind außerhalb der Nischen zu finden, da diese die Nischen verlassen (Yoshida et al., 2007). Es lässt sich folgern, dass die Lokalisation der Spermatogonien mit der Regulation der Spermatogonendifferenzierung in Zusammenhang steht. Bei der vorliegenden Arbeit konnte diese Tatsache als zusätzliches Identifikationskriterium der Keimzellen für die Expressionsmusteranalyse herangezogen werden. Ob solche Nischen auch im humanen Gewebe vorliegen, ist Gegenstand der aktuellen Forschung.

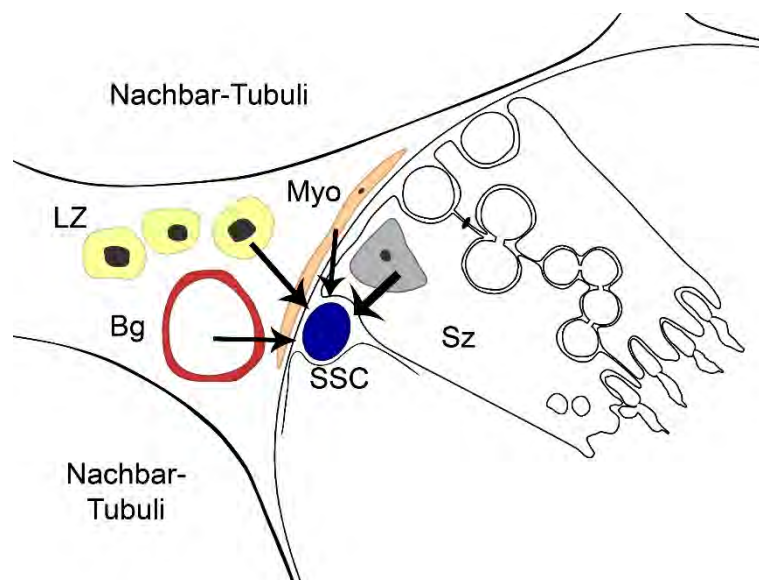


Abbildung 1.8: Modell einer Stammzellnische beim Nagetierhoden. Es wird angenommen, dass das umliegende Gewebe, bestehend aus Leydig-Zellen (LZ), peritubulären Myofibroblasten (Myo), Sertoli-Zellen (Sz) und Blutgefäßen (Bg) die spermatogoniale Stammzelle (SSC) durch verschiedene Stimuli beeinflusst. Modifizierte Abbildung nach Caires et al. (2010).

#### **1.4 Infertilität und pathologische Veränderungen im humanen Hoden**

Ein Mann gilt als infertil, wenn er bei regelmäßigem, ungeschütztem Verkehr innerhalb eines Jahres keinen Nachwuchs zeugen kann (Nieschlag, 2009). Für das Fehlen von Spermien im Ejakulat eines Mannes (Azoospermie) können eine Obstruktion des Samenleiters oder eine Störung bei der Keimzellreifung verantwortlich sein. Die Ätiologie der Defekte ist oft unbekannt. Eine stattgefundene Strahlen- oder Chemotherapie, Infektionen, Chromosomenanomalien, ein Diabetes mellitus oder ein Alkoholabusus können mögliche Ursachen darstellen (Cerilli et al., 2010).

Bei Infertilität ist die Kenntnis über die zugrundeliegende Pathologie von Bedeutung, weshalb eine Biopsie zu diagnostischen und gleichzeitig therapeutischen Zwecken indiziert sein kann (Dohle et al., 2012). Sowohl für die obstruktive als auch für die nichtobstruktive Azoospermie besteht die Möglichkeit einer testikulären Spermienextraktion (TESE) mit anschließender intrazytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI). Bei der deskriptiven, histologischen Klassifikation der Biopsien soll eine Aussage darüber getroffen werden, ob eine zumindest qualitativ intakte Spermatogenese vorliegt oder spezifische Defekte eruierbar sind (Bergmann & Kliesch, 2009).

Bergmann & Kliesch (1998, 2009) und Cerilli et al. (2010) nahmen eine histologische Einteilung vor, die in dieser Arbeit Anwendung findet: Bei normaler Spermatogenese (NSP) lässt sich in der ganzen Biopsie eine komplette Spermatogenese mit elongierten Spermatiden und normalem Interstitium finden. Eine Hypospermatogenese (HYP) liegt vor, wenn alle Stadien der Spermatogenese vorhanden sind, die Zahl der elongierten Spermatiden aber vermindert und die zelluläre Zusammensetzung des Keimepithels unvollständig ist. Eine weitere Pathologie ist charakterisiert durch den Arrest aller Keimzellen in spezifischen Entwicklungsstufen. Am häufigsten ist hier der Arrest der primären Spermatozyten (SZA) zu finden. Andere Defekte sind das Sertoli-Zell Only-Syndrom mit dem völligen Fehlen von Keimzellen sowie der Tubulusschatten, bei dem keine Zellen im Tubulus vorhanden sind und die Lamina propria hyalinisiert. Das Sertoli-Zell Only-Syndrom und der Tubulusschatten sind nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

#### **1.5 Score-Count-Evaluation zur Klassifikation von Spermatogenesedefekten**

Die Score-Count-Evaluation dient der Beratung betroffener Männer hinsichtlich der Erfolgswahrscheinlichkeiten einer TESE mit ICSI (Bergmann & Kliesch, 2009). Hierfür gibt es verschiedene Klassifikationen. Nach Johnsen (1970) wird jedem Tubulus im Biopsat ein Score gemäß Differenzierungsgrad der Keimzellen und Keimzellanzahl zugeordnet. Aus dem Mittelwert der Einzelergebnisse ergibt sich der Johnsen-Score. Ein Score von 4 bedeutet beispielsweise „wenige Spermatozyten (<5 pro Schnitt), keine Spermatiden,

keine Spermatozoen“, obwohl im Präparat durchaus Tubuli mit elongierten Spermatiden vorhanden sein können. Im Gegensatz dazu wird für die Klassifikation nach Bergmann & Kliesch (1998, 2009) in Hämatoxilin-Eosin-gefärbten Präparaten der Prozentsatz der Tubuli, die elongierte Spermatiden aufweisen, bestimmt. So drückt ein Score von 10 aus, dass die Tubuli der Biopsie zu 95-100% elongierte Spermatiden enthalten, während ein Score von 4 immerhin noch 35-44% elongierte Spermatiden bedeutet (s. Tabelle 1.1). Gegenüber dem Johnson-Score weist diese Methode den Vorteil auf, dass eine prognostisch relevante Aussage über das Vorhandensein oder Fehlen von elongierten Spermatiden getroffen werden kann. Deshalb bildete die Score-Count-Evaluation nach Bergmann & Kliesch (1998, 2009) in dieser Arbeit die Grundlage zur Klassifikation der verschiedenen Patientenkollektive.

Tabelle 1.1 Modifizierte Darstellung des Scores nach Bergmann & Kliesch (1998, 2009).

<b>Prozentsatz von Tubuli mit elongierten Spermatiden (%)</b>	<b>Score</b>	<b>Klassifikationen</b>
100-95	10	Normale Spermatogenese
94-85	9	
84-75	8	
74-65	7	
64-55	6	
54-45	5	Bunte Atrophie (Auftreten von Tubuli mit einer zumindest qualitativ intakten Spermatogenese neben Spermatogenesedefekten verschiedenster Art)
44-35	4	
34-25	3	
24-15	2	
14-10	1	
9-1	0,9-0,1	Überwiegende Atrophie des Keimepithels mit vereinzelter Ausbildung elongierter Spermatiden
0	0	Sertoli-Cell-Only, Arrest der Spermatogenese, testikuläre Atrophie: Tubulusschatten

Die Hypospermatogenese ist in dieser Tabelle nicht separat dargestellt.



### 1.6. Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit sollen durch ein Screening der Datenbank PubMed Marker identifiziert werden, anhand derer verschiedene Proteinexpressionsmuster in der männlichen Keimzellentwicklung der Spezies Mensch, Ratte und Maus verglichen werden können, um Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu erörtern. Dabei soll die Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Tierexperimenten auf den Menschen hinterfragt werden.

Zudem werden Marker gesucht, die eine detaillierte Analyse von Defekten bei Patienten mit verminderter Spermatogenese erlauben. Wie von Bergmann (2005) gefordert, sollen zur histologischen Beurteilung von Hodenbiopsien neben der semiquantitativen („score count“) Analyse nach Bergmann & Kliesch (1998, 2009), die ein Maß für den Erhalt der zumindest qualitativ intakten Spermatogenese liefert, auch zytologische Analysen unter Einschluss funktioneller Färbetechniken (z.B. Immunhistochemie) durchgeführt werden. Durch die Markierung spezifischer Differenzierungsstadien können die Keimzellen zu bestimmten Zeitpunkten in der Entwicklung quantifiziert werden. In Ergänzung zu Hentrich et al. (2011) liegt der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Identifikation weiterer Marker zur Klassifizierung früher Spermatogenesstadien. In einer Serienuntersuchung mit den drei Patientenkollektiven „Normale Spermatogenese“ (NSP), „Hypospermatogenese“ (HYP) und „Spermatozytenarrest“ (SZA) werden spezifische Keimzellen analysiert, um möglicherweise vorliegende prämeiotische Dysfunktionen als Ursache für Infertilität definieren zu können.

## 2 Material und Methode

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Gewebeproben

Die in dieser Studie benutzten Gewebeproben des männlichen Hodens wurden in den Jahren 1998 bis 2012 gemäß den Richtlinien der „European Association of Urology“ zu therapeutischen oder diagnostischen Zwecken entnommen und im Giessener Hodenbiopsie-Register (Hessischen Zentrum für Reproduktionsmedizin) gelistet. Alle Männer willigten ein, dass ihr Gewebe zu Forschungszwecken verwendet werden darf. Das Referenzzentrum steht unter der Leitung von Prof. Martin Bergmann und Prof. Hans-Christian Schuppe. Der Arbeit an diesem Gewebe wurde durch die Ethikkommission der Justus-Liebig-Universität Gießen zugestimmt.

Nach Entnahme wurden die Hodenpräparate zur Fixierung ca. 48 Stunden unter Lichtausschluss in Bouin'scher Lösung belassen. Anschließend erfolgte die Einbettung der Biopsien in speziellen Kassetten mit einem Paraffineinbettungsautomat der Firma Leica. Das zugehörige Protokoll der Einbettung ist in Tabelle 2.1 abgebildet. Die Paraffinblöcke mit dem Gewebe wurden bis zum Zuschnitt mit dem Rotationsmikrotom bei 4°C aufbewahrt.

Die Einteilung der mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Gewebeschnitte erfolgte durch Prof. Martin Bergmann gemäß der Score-Count-Evaluation nach Bergmann & Kliesch (1998, 2009) in die Klassifikationen „Normale Spermatogenese“ (NSP), „Hypospermatogenese“ (HYP) und „Spermatozytenarrest“ (SZA). Aus jeder Klassifikation wurden 30 anonymisierte Patienten für die vorliegende Studie ausgewählt. Die Patienten der Gruppe NSP hatten einen durchschnittlichen Score von 9,93 (Spannweite 9-10) und der Altersmedian betrug 39 (Spannweite 16-56). Der Scoremittelwert der HYP-Patienten lag bei 8,43 (Spannweite 6-10) und der Median war 37 (Spannweite 18-63). Die SZA-Patienten hatten keine elongierten Spermatisden, was einem Score von 0 entspricht. Der Altersmedian konnte mit 34,5 (Spannweite 17-69) angegeben werden.

Des Weiteren wurden Hodenpräparate von geschlechtsreifen Ratten- (Sprague-Dawley) und Mäusehoden (Jackson) verwendet. Die Proben wurden nach Entnahme auf dieselbe Art wie die menschlichen Proben in Bouin fixiert und in Paraffin eingebettet.

Tabelle 2.1: Protokoll des Paraffineinbettungsautomaten.

Arbeitsschritte	Wdh.	Zeit	Material	Temperatur
1. Entwässerung	1x	2 Std.	80% Ethanol	RT
	1x	2 Std.	96% Ethanol	RT
	3x	3 Std.	100% Ethanol	RT
2. Klären	1x	1 Std.	Xylol	RT
	2x	45 Min.	Xylol	RT
3. Einbettung	3x	40 Min.	Paraffin	59°C

RT: Raumtemperatur; Wdh.: Wiederholung

### 2.1.2 Puffer und Chemikalien

#### Bouin'sche Lösung

*Stammlösung:*

500 ml Pikrinsäure (Fluka, Sigma-Aldrich) + 167 ml Formaldehyd 37% (Merck)

*Gebrauchslösung:*

30 ml Stammlösung + 1,5 ml Eisessigsäure 100% (Merck)

#### PBS-Puffer (0,02 M phosphatgepufferte Salzlösung)

1000 ml Aqua dest. + 4 PBS-Tabletten (Gibco, Life Technologies)

#### Zitratpuffer

*Lösung A (0,1 M Zitronensäure):*

21,01 g Zitronensäure (Merck) + 1000 ml Aqua dest.

*Lösung B (0,1 M Natriumzitratlösung):*

29,41 g Natriumcitrat (Merck) + 1000 ml Aqua dest.

*Gebrauchslösung:*

25 ml Lösung B + 270 ml Aqua dest.

Unter pH-Kontrolle wurde Lösung A zugegeben, bis der pH-Wert der Gebrauchslösung 6,0 betrug.

#### Wasserstoffperoxid/Methanol-Lösung

5 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (Roth) + 45 ml Methanol (Sigma-Aldrich)

#### BSA-Puffer (1,5% Rinderserumalbumin)

1 g BSA Pulver (proteasefreies Albumin Fraktion V, Roth) + 70 ml PBS-Puffer + 21 µl Triton-X100 (Merck)

#### DAB-Lösung aus Liquid DAB+ Substrate Chromogen System

1 ml Substrate Buffer + 1 Tropfen Chromogen (K3468, Dako)



Außerdem verwendete Chemikalien

- Ethanol (vergällt, >99,6%, Berkel AHK)
- Hämalun nach Mayer (Waldeck GmbH)
- Kaiser's Glyceringelatine (Merck)
- Neo-Clear, Xylol-Ersatz (Merck)
- Real Antibody Diluent (S2022, Dako)
- Shandon™ Instant - Hämatoxylin und - Eosin (Thermo Scientific)
- Xylol (VWR International GmbH)

**2.1.3 Antikörper****2.1.3.1 Verwendete Primärantikörper**

In Tabelle 2.2 sind die Antikörper gelistet, die zur Analyse von Gemeinsamkeiten und Unterschieden der Proteinexpressionsmuster bei Ratte, Maus und Mensch verwendet wurden. Die Antikörper der Serienauswertung für die Evaluation früher Spermatogenedefekte bei den Patientenkollektiven NSP, HYP und SZA sind in Tabelle 2.3 aufgeführt.

Tabelle 2.2: Primärantikörper für die Expressionsmusteranalyse.

Name	Firma	Artikelnr.	Spezies	Klonalität	Verdünnung
Anti-ACE	Abcam, UK	ab11734	Maus	mono- klonal	1:300
Anti-H2AK5ac	Cell Signaling, USA	2576	Kanin- chen	poly- klonal	1:100
Anti-γ-H2A.X	Cell Signaling, USA	9718	Kanin- chen	mono- klonal	*1:5000 **1:100
Anti-γ-H2A.X	Millipore, USA	05-636	Maus	mono- klonal	*1:5000 **1:100
Anti-GILZ	eBioscience, USA	14-4033	Ratte	mono- klonal	*1:500 **1:100
Anti-MYBL1	Sigma-Aldrich, USA	HPA-008791	Kanin- chen	poly- klonal	1:200
Anti-SPOC1	Prof. Hans Will, Hamburg	6F6	Ratte	mono- klonal	1:10

\*: Ratte/Maus; \*\*: Mensch

Tabelle 2.3: Primärantikörper für die Serienuntersuchung am humanen Gewebe.

Name	Firma	Artikelnr.	Spezies	Klonalität	Verdünnung
Anti-OCT2	Novocastra Laboratories, UK	NCL-OCT-207	Maus	mono-klonal	1:75
Anti-SAGE1	Sigma-Aldrich, USA	HPA003033	Kaninchen	poly-klonal	1:2000
Anti-SMAD3	Enogene Biotech, USA	E021324	Kaninchen	poly-klonal	1:300

### 2.1.3.2 Getestete Primärantikörper

In Tabelle 2.4 sind alle übrigen Antikörper, die im Rahmen des PubMed-Screenings getestet wurden, gelistet. Dies sind Marker, die in der vorliegenden Arbeit auf ihre Verwendbarkeit für die Spermatogeneseevaluation untersucht wurden.

Es handelt sich hierbei um spermatogoniale Proteinexpressionsmuster (Anti-DMRT1, -PLZF, -SALL4, -SOHLH2, -SSX2-4) sowie Spermatozyten- (Anti-EGR4, -MEIG1, -SYCP3), Spermatischen- (Anti-SMAD6) und Proliferationsmarker (Anti-Ki-67). Zudem wurden Antikörper ausgewählt, die spezifische Histonmodifikationen während der Spermatogenese detektieren (Anti-H3K14ac, -H3Ser28, -JARID1B). Um auch die somatischen Zellen des Keimepithels evaluieren zu können, wurden außerdem Sertoli-Zell-Marker (Anti-TIF2, -NCOA1) getestet. Es stellte sich jedoch heraus, dass sich diese Antikörper nicht für eine lichtmikroskopische Auswertung eigneten, da sie eine schlechte Signal-Rausch-Relation (s. Kapitel 2.2.2.2) aufwiesen. Sie sind an dieser Stelle aus Gründen der Vollständigkeit aufgeführt.

Tabelle 2.4: Im Rahmen des Screenings getestete Primärantikörper.

<b>Name</b>	<b>Firma</b>	<b>Artikelnr.</b>	<b>Spezies</b>
Anti-DMRT1	Sigma-Aldrich, USA	HPA027850	Kaninchen
Anti-EGR4	Lifespan Biosciences, USA	LS-B1525	Kaninchen
Anti-H3K14ac	Abcam, UK	ab52946	Kaninchen
Anti-H3Ser28	Millipore, USA	07-145	Kaninchen
Anti-JARID 1B	Biozol, DE	H00010765-M02	Maus
Anti-Ki-67	Dako, DK	M7248	Maus
Anti-MEIG1	Sigma-Aldrich, USA	HPA044594	Kaninchen
Anti-NCOA1	Acris, DE	AM06051PU-N	Maus
Anti-PLZF	Calbiochem/Millipore, USA	OP128	Maus
Anti-PLZF	Sigma-Aldrich, USA	HPA001499	Kaninchen
Anti-SALL4	Abcam, UK	ab29112	Kaninchen
Anti-SMAD6	Santa Cruz, USA	sc-6034	Ziege
Anti-SOHLH2	Abcam, UK	ab101402	Kaninchen
Anti-SSX2-4	Dr. Ruurd Torensma, NL	E3	Maus
Anti-SYCP3	Biozol, DE	LS-C2886	Maus
Anti-TIF2	BD, USA	610984	Maus

### 2.1.3.3 Sekundärantikörper

Für die immunhistochemischen Färbungen verwendete Sekundärantikörper:

- EnVision+ System – HRP Labelled Polymer (Dako)
  - Ziegen-Anti-Maus Ig (K4001)
  - Ziegen-Anti-Kaninchen Ig (K4003)
- N-Histofine Simple Stain MAX PO / Universal Immuno-Peroxidase Polymer (Medac)
  - Kaninchen-Anti-Ziege Ig (414161F)
  - Ziege-Anti-Ratte Ig (414311F)

### 2.1.4 Geräte, Computerprogramme und sonstige Materialien

- Dako-Pen (S2002, Dako)
- Deckgläser 22x22mm (R.Langenbrinck)
- Einbettkassetten (Roth)
- Färbetröge, Färbegestelle und Färbekammern (Roth)
- Fotomikroskop, FSX100 (Olympus)
- Gourmetgarer „MultiGourmet plus FS20R“ (Braun)
- Inkubator, Function line UT12 (Heraeus)

- Lichtmikroskope
  - Mikroskop Dialux 20 (Leitz)
  - Mikroskop Leitz Laborlux S (Leica Biosystems)
- Magnetrührer (IKA)
- Mikroreaktionsgefäße/„Eppis“ 0,65-2ml (Eppendorf, Mettler Toledo, Roth)
- Minizentrifuge (Sprout)
- Mischgerät Polymax 1040 (Heidolph)
- Paraffineinbettungsautomat TP 1050 (Leica Biosystems)
- Pipetten und -spitzen (Eppendorf, Mettler Toledo und Roth)
- pH-Meter SevenEasy (Mettler Toledo)
- Präzisionswaage (Mettler Toledo)
- Reinigungstücher Kimwipe (Kimberly Clark)
- Rotationsmikrotom RM 2235 (Leica Biosystems)
- Schüttelgerät (IKA)
- Softwareprogramme
  - Adobe Photoshop CS2
  - Adobe Illustrator CS2
  - FSX-BSW Software (Olympus)
  - GraphPad InStat 3
  - GraphPad Prism 6
  - Microsoft Office Excel, PowerPoint und Word 2013
- SuperFrost Plus Objektträger (R. Langenbrinck)
- Wasseraufbereitungssystem Elix Essential 3 und Simplicity (Millipore)
- Wasserbad (GFL)

## 2.2 Methode

### 2.2.1 Paraffinschnitte

Die in Paraffin eingebetteten Hodenbiopsien wurden mit dem Rotationsmikrotom in 5µm dünne Schnitte geschnitten. Diese glitten von der Messerklinge in das angrenzende Raumtemperaturwasserbad. Durch Eintauchen eines Objektträgers in das Wasserbad hafteten die Schnitte darauf und wurden in einem zweiten Wasserbad (40-42°C) gestreckt. Aus diesem wurden die Schnitte auf die beschichteten SuperFrost Plus Objektträger aufgezogen und über Nacht im Inkubator bei 37°C getrocknet. So vorbereitet konnten die Gewebeschnitte für die anschließende Immunhistochemie verwendet werden.

## 2.2.2 Immunhistochemie

### 2.2.2.1 Erläuterung der Methode

Der immunhistochemischen Methode (IHC) liegt zugrunde, dass Antigene, die als Proteinstrukturen auf Zellen exprimiert werden, von Antikörpern erkannt werden. Diese Primärantikörper binden spezifisch an ein zugehöriges Proteinepitop im Gewebe. Zur Visualisierung dieser Antigene wird mittels der Primärantikörper, an die weitere Antikörper (Sekundärantikörper) koppeln, in einer zweischrittigen Färbemethode eine charakteristische Färbung induziert. Diese ermöglicht eine Analyse der verwendeten Gewebeproben. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte des immunhistochemischen Verfahrens erläutert.

Zur Vorbehandlung müssen das Paraffin aus dem Gewebe gelöst und die dünnen Hodenschnitte in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert werden. Die Quervernetzungen (sog. Maskierungen) zwischen Proteinen im Gewebe, die bei der Fixierung entstanden sind, werden bei der Demaskierung durch Erhitzen in einem Antigen-Retrieval-Puffer gelöst (Freilegung der Epitope). Weiter muss die endogene Peroxidase des Gewebes gehemmt werden, damit nur die Peroxidase des Sekundärantikörper-Gemischs zur Farbreaktion beiträgt. Hierfür erfolgt eine Behandlung der Proben mit Wasserstoffperoxid-Methanol. Mögliche elektrostatische Wechselwirkungen im Gewebe, die zu unspezifischen Antikörperbindungen führen, werden durch die Applikation von Rinderserumalbumin blockiert.

Erst jetzt erfolgt das Auftragen von Primär- und Sekundärantikörper. Letzterer ist Teil des EnVision™+ Systems (Dako) und mit einem Dextran-Polymer verbunden, an das zusätzlich das Enzym Peroxidase gekoppelt ist (s. Abbildung 2.1). Diese Horseradish Peroxidasen (HRP, Meerrettichperoxidase) reagieren im nächsten Schritt mit der zugegebenen Wasserstoffperoxid-Chromogen-3,3' Diaminobenzidin (DAB)-Lösung, wodurch eine braune Farbe am detektierten Epitop erzeugt wird. Die große Anzahl an Peroxidasen dient der Verstärkung des Signals. Die Sekundärantikörper-Lösungen N-Histofine Simple Stain MAX PO (Medac) funktionieren nach dem gleichen Prinzip, nur besteht hier das Polymer aus Aminosäuren. Die Sekundärantikörper sind, wie in Kapitel 2.1.3.3 beschrieben, spezifische Anti-Maus, -Ratte, -Kaninchen, oder -Ziege Immunglobuline.

Das Präparat wird abschließend mit Hämalun eingefärbt, so dass die Zellenidentifikation durch den Kontrast zwischen den braun markierten Epitopen inmitten des blauen Hodengewebes erleichtert wird.

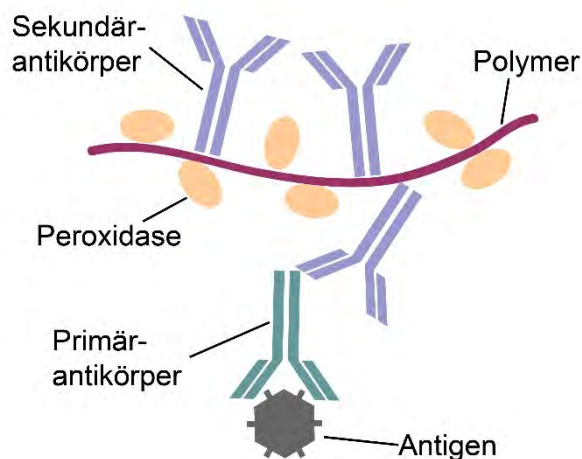


Abbildung 2.1: Zweistufige Polymermethode mit dem EnVision™+ System (Dako) bzw. dem N-Histofine Simple Stain MAX PO-System (Medac).

#### 2.2.2.2 Immunhistochemisches Protokoll

Für diese Arbeit wurde ein standardisiertes IHC-Protokoll angewandt. Im ersten Arbeitsschritt wurde die Vorbehandlung der dünnen Gewebeschnitte, die auf den Objektträgern noch von Paraffin umgeben sind, begonnen. Bei Raumtemperatur wurden diese durch NeoClear entparaffiniert und mittels einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (s. Tabelle 2.5).

Tabelle 2.5: Protokoll für die Entparaffinierung und Rehydrierung des Gewebes.

Arbeitsschritte	Wdh.	Zeit	Material	Temperatur
1. Entparaffinierung	3x	20 Min.	NeoClear	RT
2. Rehydrierung	2x	5 Min.	Ethanol (100%)	RT
	2x	5 Min.	Ethanol (96%)	RT
	2x	5 Min.	Ethanol (70%)	RT
	1x	5 Min.	Aqua dest.	RT

RT: Raumtemperatur; Wdh.: Wiederholung

Zur Epitopfreilegung (Demaskierung) wurden die Schnitte im Gourmetgarer in Zitratpuffer für 20 Minuten bei 100°C erhitzt. Anschließend verblieben die Proben für weitere 20 Minuten zum Abkühlen im Zitratpuffer. Es folgte dreimaliges Spülen in 0,02 M PBS-Puffer für je fünf Minuten.

Durch eine dreißigminütige Behandlung des Gewebes in einer dreiprozentigen Wasserstoffperoxid/Methanol-Lösung wurde die endogene Peroxidase des Gewebes blockiert. Es schloss sich ein Spülgang mit drei mal fünf Minuten in 0,02 M PBS-Puffer an. Die

Schnitte wurden danach zum Blockieren potenzieller, unspezifischer Bindungsstellen 20 Minuten in 1,5%-Rinderserumalbumin inkubiert.

Um die optimale Antikörperkonzentration für die verschiedenen Marker zu bestimmen, wurde jeder Antikörper zunächst in einer Verdünnung von 1:100 getestet. Als Verdünnungsmedium wurde die Lösung Real Antibody Diluent benutzt. Je nachdem, wie intensiv die Färbung unter dieser Konzentration ausfiel, wurden alternative Verdünnungen getestet. Als finale Verdünnung für die nachfolgende Analyse wurde schließlich diejenige gewählt, bei der ein maximales Signal bei gleichzeitig geringer Hintergrundfärbung erzielt werden konnte (Signal-Rausch-Relation). Die ermittelten Verdünnungen sind in Kapitel 2.1.3.1 aufgelistet.

Pro Schnitt wurden zur vollständigen Bedeckung des Gewebes 100µl der jeweiligen Antikörperverschüttung benötigt. Die Objektträger wurden mit einem Reinigungstuch trockengewischt, wobei um das Gewebe ein ca. 0,5 x 0,5 cm großer Bereich feucht belassen wurde, so dass das Gewebe weiterhin mit dem BSA-Puffer bedeckt blieb. Dieses Quadrat wurde mit einem Dako-Pen umzeichnet. So konnten sich die pipettierten 100µl der jeweiligen Primärantikörper nur innerhalb des umzeichneten Bereiches verteilen und es wurde ein Verlaufen des Primärantikörpers auf dem Objektträger verhindert. Die Objektträger inkubierten zum Schutz vor Austrocknung in einer feuchten, lichtundurchlässigen Färbekammer bei 4°C über Nacht.

Am darauffolgenden Tag wurde überschüssiger, nichtgebundener Primärantikörper dreimal mit 0,02 M PBS-Puffer für je fünf Minuten ausgewaschen. Dann wurden pro Schnitt drei Tropfen des entsprechenden Sekundärantikörpers („Ready-to-use“) auf das Gewebe getropft und bei Raumtemperatur 30 Minuten in der feuchten Färbekammer inkubiert. Darauf folgte ein weiterer Spülgang mit 0,02 M PBS-Puffer für drei mal fünf Minuten.

Um die Antikörperbindung farblich darzustellen, wurden die Proben unter dem Abzug mit jeweils drei Tropfen DAB-Lösung aus dem Liquid DAB+ Substrate Chromogen System (Dako) bedeckt. Die Intensität der Färbung wurde unter dem Mikroskop beobachtet, so dass für jeden Antikörper die optimale Färbezeit bestimmt werden konnte. Durch Überführen in eine Küvette mit destilliertem Wasser wurde der Färbeprozess gestoppt. Reste der DAB-Lösung wurden durch dreimaliges Spülen mit destilliertem Wasser für je fünf Minuten ausgewaschen. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun nach Mayer für zehn Sekunden pro Schnitt und durch anschließendes, zehnminütiges Bläuen in fließendem Leitungswasser.

Abschließend wurden die Objektträger mit erwärmter Kaiser's Glycingelatine und Deckgläsern eingedeckt. Falls nicht näher beschrieben, erfolgten die einzelnen Schritte des Protokolls bei Raumtemperatur sowie die Spülvorgänge, die Inkubation in der

Wasserstoffperoxid/Methanol-Lösung und dem BSA-Puffer auf einem Schüttelgerät der Firma IKA. Der Umgang mit den Antikörpern erfolgte auf Eis.

### **2.2.2.3 Kontrollen in der Immunhistochemie**

Um zu überprüfen, ob die angewandten Systeme nur die zu detektierenden Antigene markieren, wurden negative Reagenzkontrollen durchgeführt. Dabei durchliefen die Gewebeproben dieselben Prozesse wie die eigentlichen Färbereien, jedoch wurde kein Primärantikörper, sondern stattdessen nur das Real Antibody Diluent zur Inkubation über Nacht auf das Gewebe gegeben. Dadurch konnte bestätigt werden, dass das verwendete Detektionssystem keine falsch-positiven Reaktionen aufgrund unspezifischer Bindungen hervorruft. Da die positive Farbreaktion in jeder Serie reproduzierbar war und das Ergebnis gut im Lichtmikroskop beurteilt werden konnte, wurden keine zusätzlichen Positivkontrollen durchgeführt.

### **2.2.3 Auswertung und Dokumentation**

Die Analyse der Expressionsmuster im Spermatogenesekontext erfolgte nach sorgfältiger Studie der morphologischen Eigenschaften des Keimepithels und der Keimzellen von Ratte, Maus und Mensch. Unter Zuhilfenahme der Abbildung 1.5 – 1.7 (s. Kapitel 1.3.3) wurde den Hodentubuli der Nagetiere das entsprechende Stadium zugeteilt bzw. die vorliegenden Stadien im humanen Tubulus ermittelt, damit eine richtige Zuordnung der Keimzellen gewährleistet war. Die graphische Darstellung der Antigenexpression im zeitlichen Verlauf der Spermatogenese wurden mit Microsoft Office Excel 2013 erstellt. Für die Serienauswertung mit den Markern OCT2 (octamer binding protein 2), SAGE1 (sarcoma antigen 1) und SMAD3 (SMAD-Signalprotein 3) wurden pro Gewebeschnitt durchschnittlich  $26,63 \pm 12,58$  Hodentubuli-Querschnitte ausgezählt und anschließend der Mittelwert der positiven Zellen pro Tubulus für dieses Präparat gebildet. Aufgrund der Ergebnisse von Hentrich et al. (2011), die eine signifikante Reduktion der Sertoli-Zellzahlen bei SZA-Patienten feststellten, wurden die Keimzellen nicht anhand der Sertoli-Zellratio quantifiziert (s. Kapitel 4.3.4). Zudem wurde bei der Auszählung der Peritubulärzellkerne von exemplarisch fünf NSP- und fünf SZA-Patienten deutlich, dass diese fast identische Peritubulärzahlen pro Tubulusquerschnitt aufweisen. Es ließen sich für die NSP-Patienten  $9,94 \pm 1,04$  und für die SZA-Patienten  $9,32 \pm 1,18$  Peritubulärzellkerne feststellen. Folglich war nicht davon auszugehen, dass unterschiedliche Keimzellzahlen der untersuchten Gewebeproben aus einer veränderten Tubulusarchitektur resultieren. Alle Ergebnisse wurden mit Microsoft Office Excel 2013 dokumentiert.



Da Hentrich et al. (2011) Anti-SMAD3 bereits als Marker für pachytäne Spermatozyten etablierten und somit schon eine Vielzahl an immunhistochemisch markierten und ausgewerteten Präparaten vorhanden war, konnte für diese Studie zum Teil darauf zurückgegriffen werden. Im Unterschied zu Hentrich et al. (2011) wurden für die SZA-Gruppe jedoch nur Patienten mit einem Score von 0 ausgewählt, wodurch ein homogeneres Kollektiv des Krankheitsbildes SZA in dieser Studie vorlag.

Die gesamte Auswertung wurde unter dem Lichtmikroskop Dialux 20 in den Vergrößerungen x6.3, x16 und x25 durchgeführt. Die Abbildung 2.2 und 2.3 zeigen exemplarisch, welche Nuancen der Farbintensität als „positive Färbung“ (Zelle wird gezählt) und welche als „negative Färbung“ (Zelle wird nicht gezählt) definiert wurden. Zur Dokumentation der Ergebnisse wurden mehrere, zufällig ausgewählte Proben der Patientengruppen mit dem Fotomikroskop FSX100 fotografiert. Die Bildbearbeitung erfolgte mit Adobe Photoshop CS2.

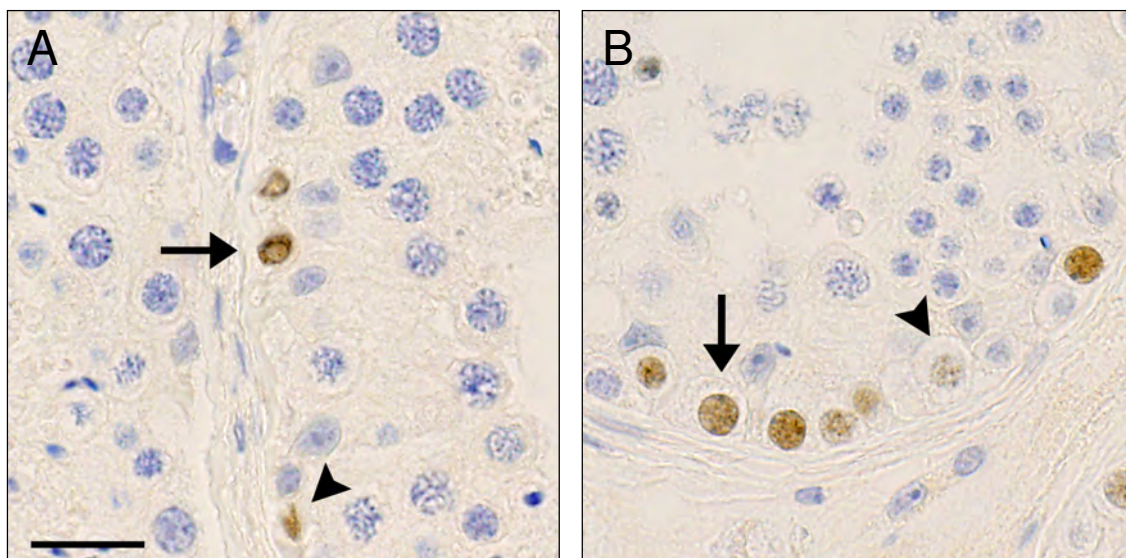


Abbildung 2.2: Darstellung des Grenzbereichs im Auszählverfahren. HYP-Patient mit Nachweis von OCT2 (A) oder SAGE1 (B). Pfeile: Beispiele positiv gewerteter Zellen, Pfeilspitzen: nicht gewertete Färbungen, da sie entweder nicht sicher einer Zelle zuzuordnen waren oder die Zellen eine zu schwache bis keine Färbung zeigten. Maßstabsbalken: 25µm.

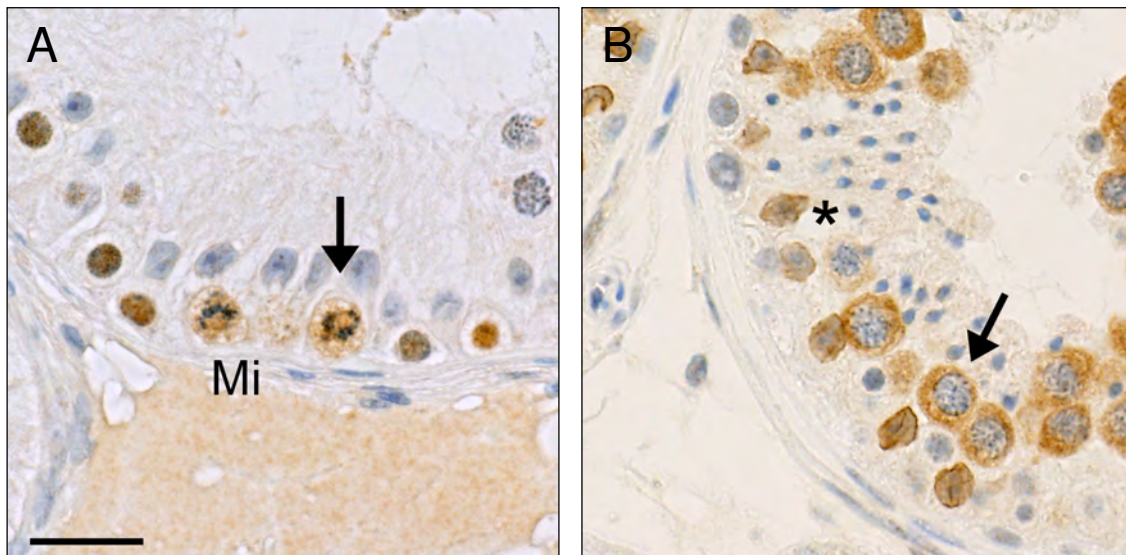


Abbildung 2.3: Darstellung des Grenzbereichs im Auszählverfahren. (A) SZA-Patient, Nachweis von SAGE1 u.a. in mitotisch teilenden Spermatogonien (Mi); (B): NSP-Patient, Nachweis von SMAD3. Pfeile: Beispiele positiv gewerteter Zellen, \*: SMAD3-positive Sertoli-Zellkerne wurden nicht gewertet. Maßstabsbalken: 25µm.

#### 2.2.4 Statistische Analyse

Die Ergebnisse der Serienfärbung wurden mit dem nicht-parametrischen Wilcoxon-Mann-Whitney-Test für unabhängige Stichproben auf Signifikanz getestet. Hierfür wurden die ermittelten Daten mit GraphPad InStat 3 jeweils für NSP versus HYP, NSP versus SZA und HYP versus SZA ausgewertet. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert von  $\leq 0,05$  festgelegt.

Mit Hilfe von GraphPad Prism 6 wurde eine Grenzwertoptimierungskurve (Receiver Operating Characteristic-Analyse) erstellt, anhand derer der beste diagnostische Grenzwert (Cut-Off) für die jeweiligen Testreihen ermittelt werden konnte. Dazu wurde neben Sensitivität und Spezifität auch die positive Likelihood-Ratio ( $LR^+$ , Wahrscheinlichkeitsverhältnis) errechnet. Die  $LR^+$  beschreibt, wievielfach häufiger ein positives Testresultat bei einer erkrankten Person im Vergleich zu einer nicht erkrankten Person ist, wobei eine  $LR^+ > 1$  die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass die untersuchte Erkrankung vorliegt (Jaeschke et al., 1994). Die LR fasst somit die Bilanz aus Sensitivität und Spezifität zusammen. In Tabelle 2.6 ist eine Einteilung der Wahrscheinlichkeitsverhältnisse abgebildet, die eine Einschätzung darüber zulässt, wie gut sich die Cut-Offs als diagnostisches Mittel zur Unterscheidung zwischen „gesund“ oder „krank“ im vorliegenden Kollektiv eignen.

Tabelle 2.6: Interpretation der  $LR^+$ , modifiziert aus Jaeschke et al. (1994).

$LR^+$	Krankheitswahrscheinlichkeit („Trennschärfe“)
$> 10$	eindeutig
5 – 9,99	moderat
2 – 4,99	gering (aber nicht unbedeutend)
1 – 1,99	gering (eher unbedeutend)

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Deskriptive Analyse der Expressionsmuster

Mit dem Ziel, immunhistochemische Marker zu identifizieren, die verschiedene Stadien der Spermatogenese klassifizieren, wurde die Datenbank PubMed nach Publikationen über Proteine durchsucht, die in spezifischen Entwicklungsphasen der Spermatogenese exprimiert werden. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf der Proteinexpression in frühen Stadien, wie den Spermatogonien und den (prä-)leptotänen Spermatozyten.

Viele Proteine wurden meist nur an einer Spezies beschrieben, so dass deren Expression in der vorliegenden Arbeit in Ratte, Maus und Mensch gegenüberstellend analysiert werden sollte um die Spermatogenese genauer zu evaluieren. Ausgehend von verschiedenen getesteten Proteinmarkern (s. Kapitel 2.1.3.1 und 2.1.3.2) wurden die ausgewählt, die sehr gute immunhistochemische Färbeeigenschaften zeigten. Diese definierten sich zum einen durch eine reproduzierbare Expression, die mit den beschriebenen Ergebnissen in der Literatur größtenteils übereinstimmten, zum anderen zeigten diese Marker eine gute Signal-Rausch-Relation und ließen sich so den verschiedenen Spermatogenesestadien sicher zuordnen.

Die untersuchten Marker wurden entsprechend ihrer Charakteristika unterteilen in:

- Marker, die Keimzellen in der frühen Spermatogenese oder der Spermiogenese detektieren (s. Kapitel 3.1.1),
- Marker gegen Proteinepitope, die sowohl in Stadien der Spermatogenese als auch der Spermiogenese exprimiert sind (s. Kapitel 3.1.2),
- Marker für die Serienuntersuchung am humanen Hoden (s. Kapitel 3.3).

Wie in Kapitel 2.2.3 erläutert, erfolgte die Identifikation der Keimzelltypen im Hoden der Nagetiere und des Menschen unter Beachtung der zytomorphologischen Charakteristika und unter Berücksichtigung der spezifischen Spermatogenesestadien. Anzumerken ist, dass die sekundären Spermatozyten in den folgenden Beschreibungen nicht berücksichtigt wurden. Da sie aufgrund der kurzen Verweildauer in histologischen Präparaten nur selten zu finden sind, waren sie weniger gut geeignet, um Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen den Spezies zu evaluieren.

### 3.1.1 Keimzellproteine in der frühen Spermatogenese oder Spermiogenese

Zunächst werden die Proteine beschrieben, die in der frühen Spermatogenese während der Zellvermehrung (Mitose) und der Zelldifferenzierung (Meiose) exprimiert werden. Des Weiteren erfolgt die Charakterisierung eines Proteins, das in Keimzellstadien der Spermiogenese und in Spermatozoen nachweisbar ist.

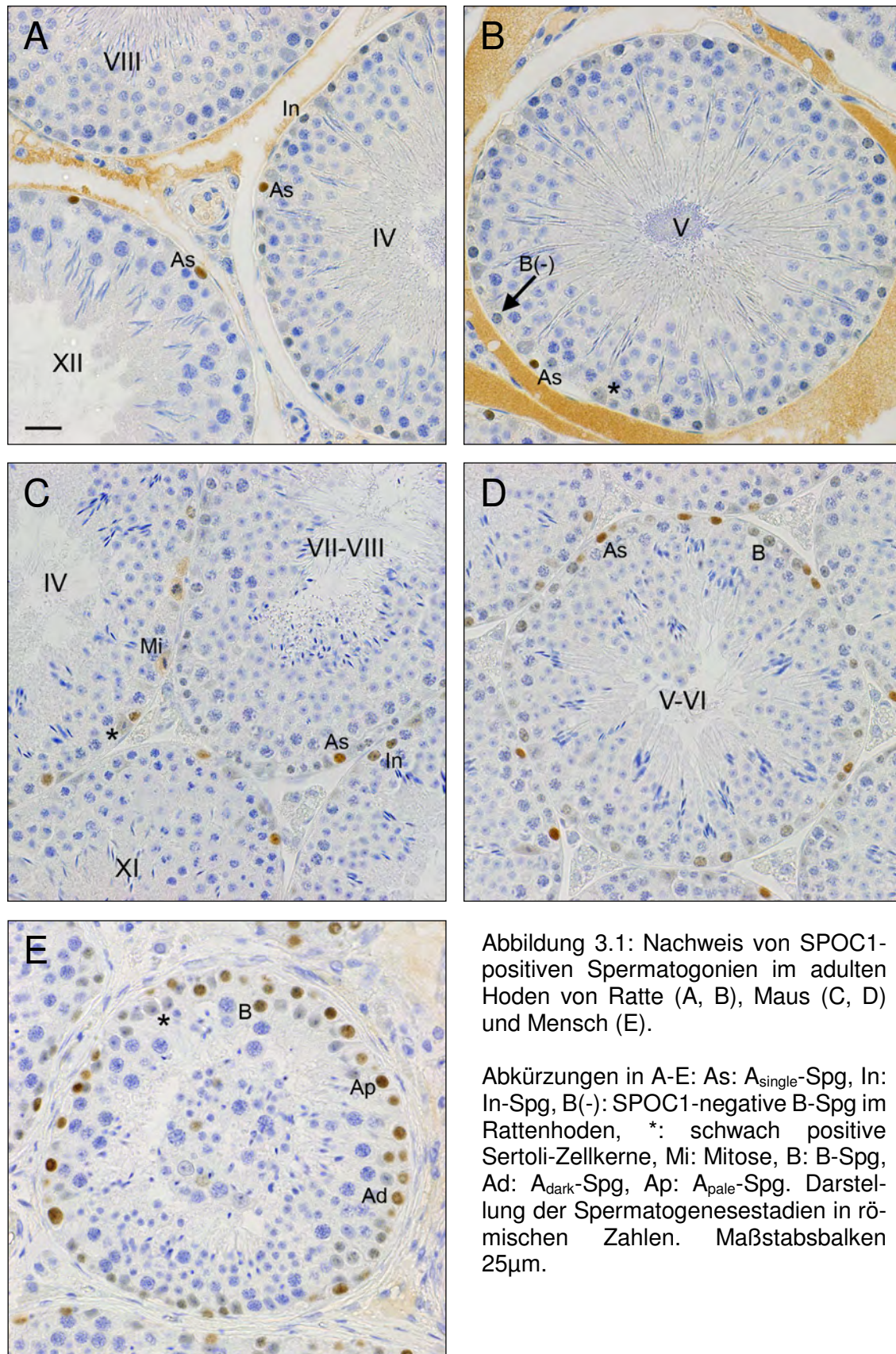
#### 3.1.1.1 SPOC1 als spermatogonialer Marker

Da das chromatin-assoziierte SPOC1-Protein (survival time-associated PHD finger protein in ovarian cancer 1, PHF 13) neben ovariellen Karzinomzellen auch in Spermatogonien exprimiert wird (Mohrmann et al., 2005; Kinkley et al., 2009), war es für diese Studie von besonderem Interesse. Mit Hilfe des Markers sollte der Zeitpunkt vor dem Meiose-eintritt in den verschiedenen Spezies analysiert werden.

In der adulten Ratte war SPOC1 in den Nuklei der Spermatogonien A<sub>s</sub> bis A<sub>1-4</sub> nachweisbar (s. Abbildung 3.1 A, B). Im Gegensatz zur Ratte detektierte der Marker bei der Maus zusätzlich zur beschriebenen Lokalisation in A<sub>s</sub> bis A<sub>1-4</sub> eine Proteinexpression in den weiter differenzierten Spermatogonien In-Spg und B-Spg (Stadium II-VI, s. Abbildung 3.1 C, D). In den Gewebeschnitten von Ratte und Maus waren außerdem auch die Sertoli-Zellkerne sehr schwach durch Anti-SPOC1 markiert (s. Abbildung 3.1 B, C).

Verglichen mit den Nagetieren ließ sich für den humanen Hoden ein ähnliches Expressionsmuster feststellen. Hier wurden die Spermatogonien mit Stammzellcharakter (A<sub>dark</sub> und A<sub>pale</sub>) und auch differenzierte B-Spg durch Anti-SPOC1 detektiert (s. Abbildung 3.1 E), was dem SPOC1-Expressionsmuster der Maus entspricht. Des Weiteren wurden im humanen Hodengewebe, ähnlich wie im Nagetierhoden, Sertoli-Zellkerne blass markiert (s. Abbildung 3.1 E), weshalb sich der Marker nicht für die Patienten-Serienauswertung eignete.





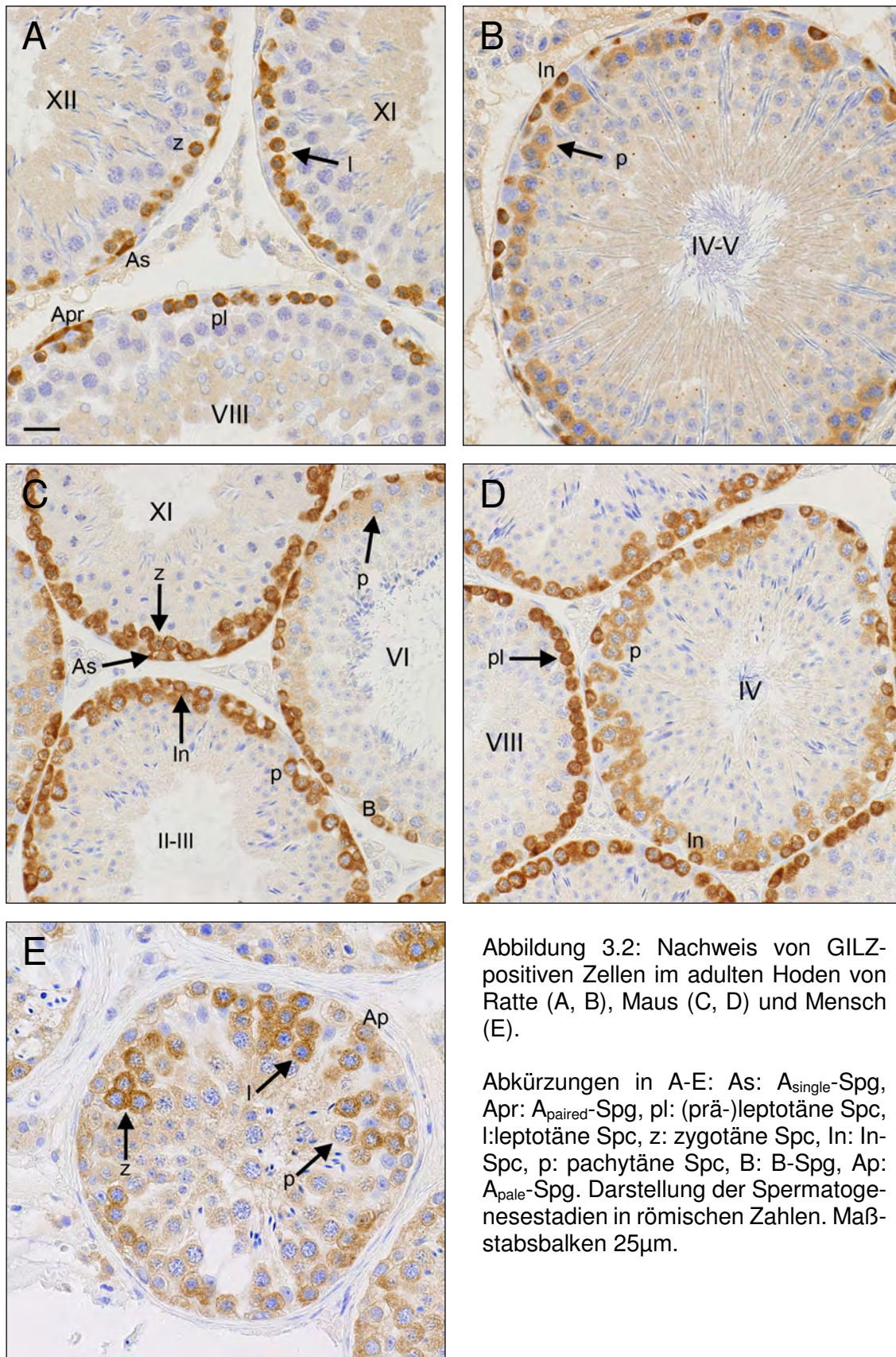
### 3.1.1.2 GILZ als Marker für Spermatogonien und Spermatozyten

Das Protein GILZ (glucocorticoid-induced leucine zipper) wurde im adulten Maushoden in proliferierenden Spermatogonien und (prä-)leptotänen Spermatozyten beschrieben (Romero et al., 2012). Aufgrund der Intention, spezifische Marker zu identifizieren, die in frühen Keimzellstadien exprimiert werden, wurde dieses Protein ausgewählt.

Im Hodengewebe der adulten Ratte zeigte sich ein ähnliches Expressionsmuster wie in der adulten Maus. Bei beiden Spezies war GILZ in den Stammzellen und Progenitorzellen ( $A_s$ ,  $A_{pr}$  und  $A_{al}$ ) sowie in sich differenzierenden Spermatogonien  $A_{1-4}$ , In-Spg und B-Spg lokalisiert (s. Abbildung 3.2 A-D). Anti-GILZ markierte weiterhin (prä-)lepto- und zygotäne Spermatozyten deutlich. Die folgenden pachytänen Stadien wiesen mit zunehmender Reife eine geringere Expression von GILZ auf, so dass in den pachytänen Spermatozyten ab Stadium VI (Ratte) bzw. ab Stadium VII (Maus) keine GILZ-Expression mehr zu finden war. Abbildung 3.2 (B, C) zeigt die blasser werdende Markierung der späteren GILZ-positiven pachytänen Spermatozyten im Ratten- und Maushoden. Hervorzuheben ist, dass GILZ in allen Keimzellen zytoplasmatisch exprimiert und vor allem im lepto- und zygotänen Stadium sehr kernnah lokalisiert war.

Verglichen mit Ratte und Maus konzentrierte sich die Expression von GILZ im humanen Hodengewebe auf spätere Entwicklungsstufen. Die zytoplasmatische Lokalisation war hier vor allem in lepto- und zygotänen sowie frühen pachytänen Spermatozyten im Stadium I und II sichtbar (s. Abbildung 3.2 E). Einige  $A_{pale}$  und B-Spg wiesen eine blasse Lokalisation im Zytoplasma auf (s. Abbildung 3.2 E). Die Färbung im humanen Gewebe zeigte insgesamt ein schlechteres Signal-Rausch-Verhältnis als im tierischen Gewebe.







### 3.1.1.3 MYBL1 als Proteinmarker der ersten Reifeteilung der Meiose

In der Spermatogenese ist die erste Reifeteilung ein komplexer Prozess, dessen Mechanismen Gegenstand der aktuellen Forschung sind. Der Transkriptionsfaktor MYBL1 (myeloblastosis oncogene-like 1, A-MYB) wird als einer der Haupt-Regulatoren der Meiose beschrieben (Bolcun-Filas et al., 2011). So war es für die vorliegende Studie von Bedeutung, mittels MYBL1 wichtige Stadien der Meiose analysieren zu können.

Immunhistochemisch war MYBL1 in den Nagetierhoden in den gleichen Entwicklungsstufen zu finden. Das Protein konnte ab pachytänen Spermatozyten im Stadium I-II nachgewiesen werden (s. Abbildung 3.3 A - C). Danach waren alle pachytänen Spermatozyten bis zum Stadium XII (X bei der Maus) markiert. Die Expression von MYBL1 setzte sich fort in diplotänen Spermatozyten im Stadium XIII der Ratte bzw. Stadium XI der Maus bis zum Übergang von Spc II zu Step 1 runden Spermatiden (Stadium I, s. Abbildung 3.3 B). Während der Meiose war der Transkriptionsfaktor im Zellkern exprimiert. Ab Auflösung der Zellkernhülle in der Teilungsphase der Spermatozyten (Diakinese) ließ sich MYBL1 zytoplasmatisch lokalisieren (s. Abbildung 3.3 D).

Zudem war MYBL1 auch nach stattgefundener Meiose noch exprimiert, da akrosomale Bläschen der Step 2-5 Spermatiden bzw. die akrosomale Kappe der Step 6-7 Spermatiden bei Ratte und Maus (Stadium II-VII) durch den Marker detektiert wurden (s. Abbildung 3.3 A, C).

Verglichen mit der Expression im Nagetierhoden konnte MYBL1 in den gleichen Entwicklungsstadien des humanen Hodengewebes nachgewiesen werden und besitzt damit ein ähnliches Muster. Hier konnte MYBL1 in pachytänen Spermatozytenkernen der Stadien I-V sowie in wenigen runden Spermatidenkerne im Stadium I beobachtet werden (s. Abbildung 3.3 E).

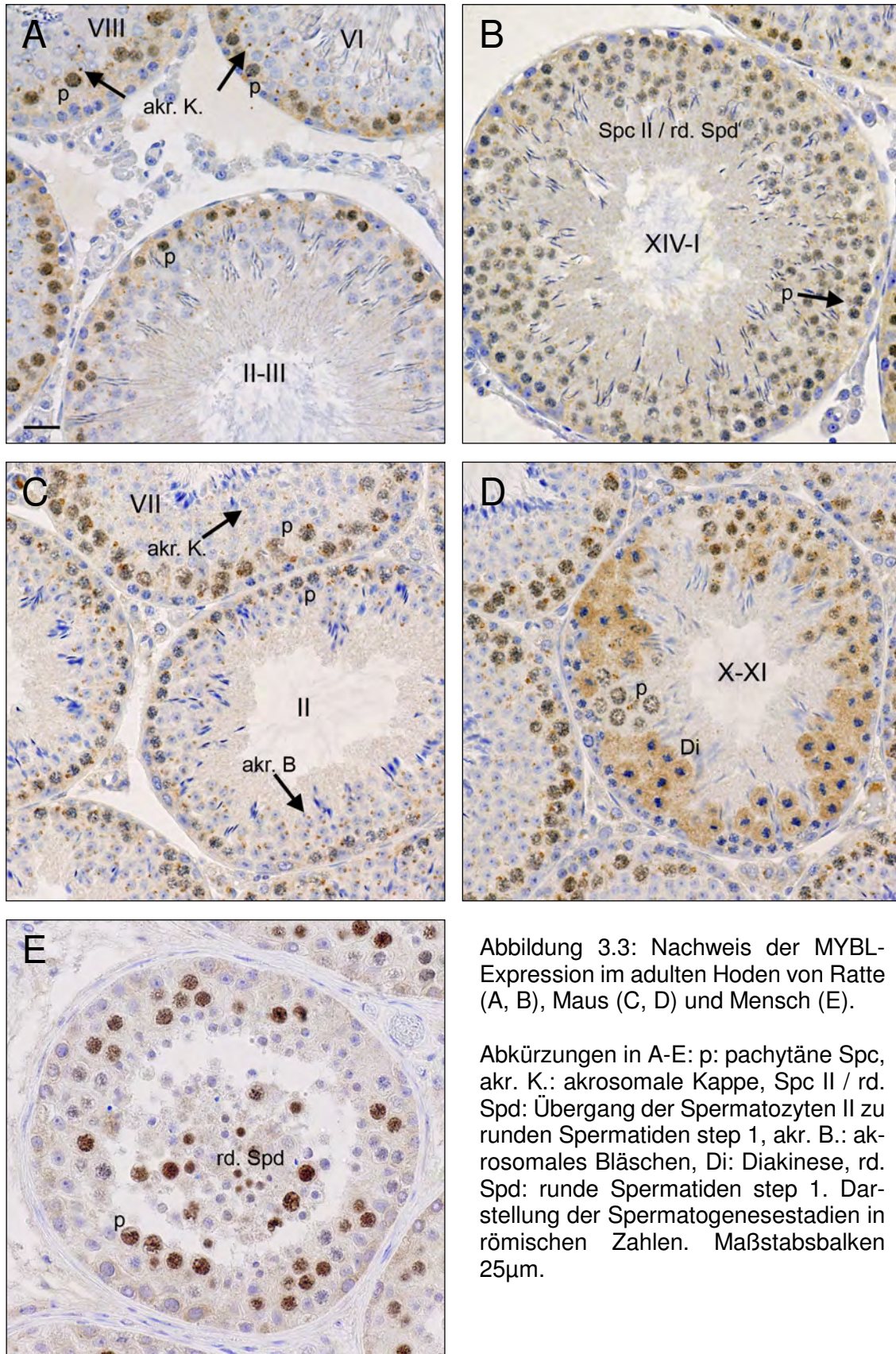


Abbildung 3.3: Nachweis der MYBL-Expression im adulten Hoden von Ratte (A, B), Maus (C, D) und Mensch (E).

Abkürzungen in A-E: p: pachytäne Spc, akr. K.: akrosomale Kappe, Spc II / rd. Spd: Übergang der Spermatozyten II zu runden Spermatozyten step 1, akr. B.: akrosomales Bläschen, Di: Diakinese, rd. Spd: runde Spermatozyten step 1. Darstellung der Spermatogenesestadien in römischen Zahlen. Maßstabsbalken 25µm.

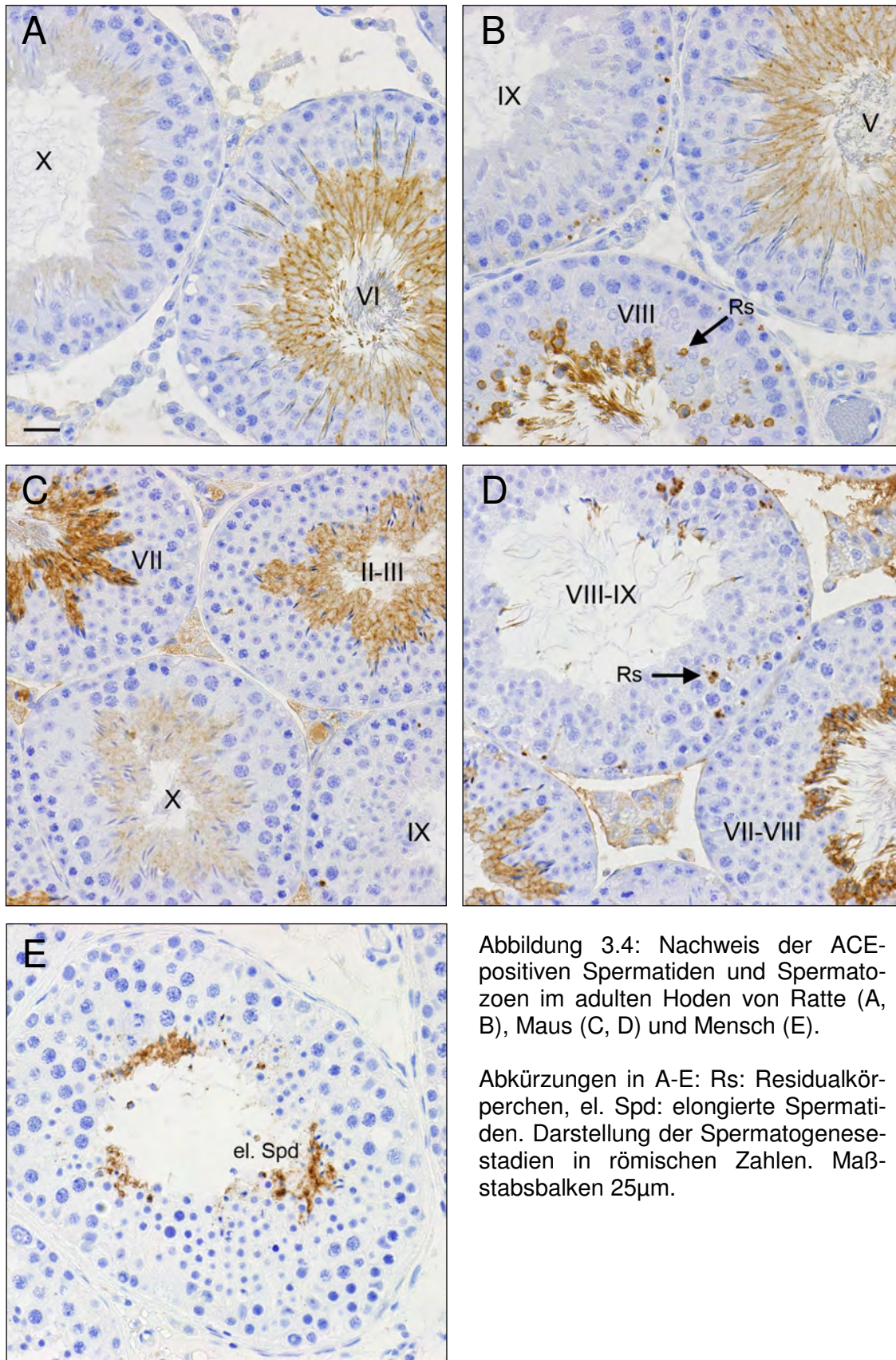
#### **3.1.1.4 ACE als Marker für elongierte Spermatiden und Spermatozoen**

Um auch späte Stadien der Spermatogenese evaluieren zu können, wurde die Auswahl durch einen weiteren Marker ergänzt. Das Protein ACE (angiotensin I-converting enzyme) wurde in der Maus in elongierten Spermatiden und Spermatozoen beschrieben (Pauls et al., 2003). Dies sollte in der vorliegenden Studie überprüft und spezieübergreifend verglichen werden.

Bei Ratte und Maus wurde das Protein ACE ab Step 10 elongierten Spermatiden (Stadium X) im luminalen Schwanzteil exprimiert. Alle folgenden Spermatidenstufen sowie die Spermatozoen zeigten ebenfalls eine ACE-Expression (s. Abbildung 3.4 A-D); zusätzlich war das Protein auch in den Residualkörperchen lokalisiert (s. Abbildung 3.4 B, D).

Für den menschlichen Hoden war Anti-ACE ein interessanter Marker, da analysiert werden sollte, ob dieser die Score-Einteilung nach Bergmann & Kliesch (1998, 2009) durch die immunhistochemischen Detektion von Spermatiden erweitern kann. Wie auch in den Nagetierhoden war im humanen Gewebe die luminale Schwanzregion von elongierten Spermatiden und Spermatozoen markiert (s. Abbildung 3.4 E). Nach einer ersten Auszählreihe konnte jedoch festgestellt werden, dass ACE erst ab Step 5 Spermatiden (Stadium V) exprimiert war und in einigen männlichen Gewebeschnitten auch elongierte Spermatiden ohne Markierung nachweisbar waren. Da durch ACE nicht zuverlässig alle elongierten Spermatiden in den Tubuli von männlichen Gewebeschnitten identifiziert werden konnten, eignete sich der Antikörper nicht für eine markergestützte serielle Quantifikation der Spermiogenese in den verschiedenen Patientengruppen.





### 3.1.2 Wiederkehrende Proteinexpression in der Spermatogenese

Neben einmalig exprimierten Proteinen wurden auch solche evaluiert, die im Hodengewebe von Ratte, Maus und Mensch sowohl in frühen Stadien der Spermatogenese als auch wiederkehrend in späteren Stadien nachzuweisen sind.

Während der Spermatogenese geschehen Vermehrung, Differenzierung und Reifung von Keimzellen durch eine dynamische Änderung der morphologischen Strukturen. Hierbei gibt es Strukturproteine, die zu verschiedenen Zeitpunkten in der Entwicklung von Keimzellen exprimiert werden. Ein Protein kann beispielsweise eine Funktion in der frühen Differenzierung von Spermatogonien haben, anschließend durch Modifikation ausgeschaltet und in einer späteren Entwicklungsphase wieder aktiviert werden. Ein Beispiel hierfür ist die Acetylierung oder Phosphorylierung von Histonen. Die im Folgenden beschriebenen Marker detektieren solche Proteine.

#### 3.1.2.1 H2AK5ac als Marker von Spermatogonien und der späten Spermiogenese

Das an Lysin 5 acetylierte Histon H2A wurde von Hazzouri et al. (2000) in Spermatogonien, (prä-)leptotenen Spermatozyten und elongierten Spermatiden des adulten Maus- und Menschenhodens beschrieben. Als Marker für Zellen, die sich vor und nach Eintritt in die Meiose befinden, war dieser für eine mögliche Serienuntersuchung am humanen Gewebe sehr interessant, so dass die immunhistochemischen Eigenschaften detailliert untersucht wurden.

Bei Ratte, Maus und Mensch konnte das acetylierte Histon in Kernen von spermatogonialen Stammzellen, differenzierenden Spermatogonien und (prä-)leptotänen Spermatozyten detektiert werden (s. Abbildung 3.5 und 3.6). Während die Keimzellkerne bei Ratte und Maus in ähnlicher Intensität gefärbt waren, ließen sich im menschlichen Gewebe dagegen Unterschiede in der nukleären Markierung feststellen. So waren im humanen Hoden A<sub>dark</sub> und A<sub>pale</sub> Spermatogonien weniger intensiv gefärbt als die B Spermatogonien und (prä-)leptotänen Spermatozyten (s. Abbildung 3.6 D).

Zusätzlich wurden Stadien der Spermiogenese durch Anti-H2AK5ac markiert. Das Histon war im Rattenhoden in Step 9-12 elongierten Spermatiden (Stadien IX-XII) acetyliert (s. Abbildung 3.5 B). Im Maushoden konnte die beginnende Acetylierung schon in früheren Stadien beobachtet werden. Hier wies eine blasse Färbung der Step 7 Spermatiden auf die beginnende Acetylierung hin (s. Abbildung 3.6 A). Es handelt sich hierbei um die spätesten Entwicklungsstadien runder Spermatiden, welche sich danach zu elongierten Spermatiden weiterentwickeln. In Step 8-10 elongierten Spermatiden (Stadium VIII-X) ließ sich eine Acetylierung durch die starke Intensität der Markierung nachweisen. Ab



Stadium XIII (bzw. Stadium XI der Maus), das durch Diakinese-Figuren leicht zu identifizieren ist, wiesen beide Spezies nur noch wenig acetyliertes H2A in elongierten Spermatiden auf (s. Abbildung 3.6 B).

Im männlichen Hoden war wie im Nagetierhoden eine erneute Acetylierung des Histons H2A in frühen elongierten Spermatiden zu beobachten. Die markierten Spermatiden konnten als Step 4 elongierte Spermatiden (Stadium IV) identifiziert werden (s. Abbildung 3.6 D). Zusätzlich zur spezifischen Detektion von Keimzellen war im humanen Hoden H2AK5ac auch in Sertoli-Zellkernen exprimiert. Daher eignete sich der Marker wegen daraus resultierender Differenzierungsschwierigkeiten nicht für eine Serienauswertung früher Spermatogonienstadien (s. Abbildung 3.6 D).

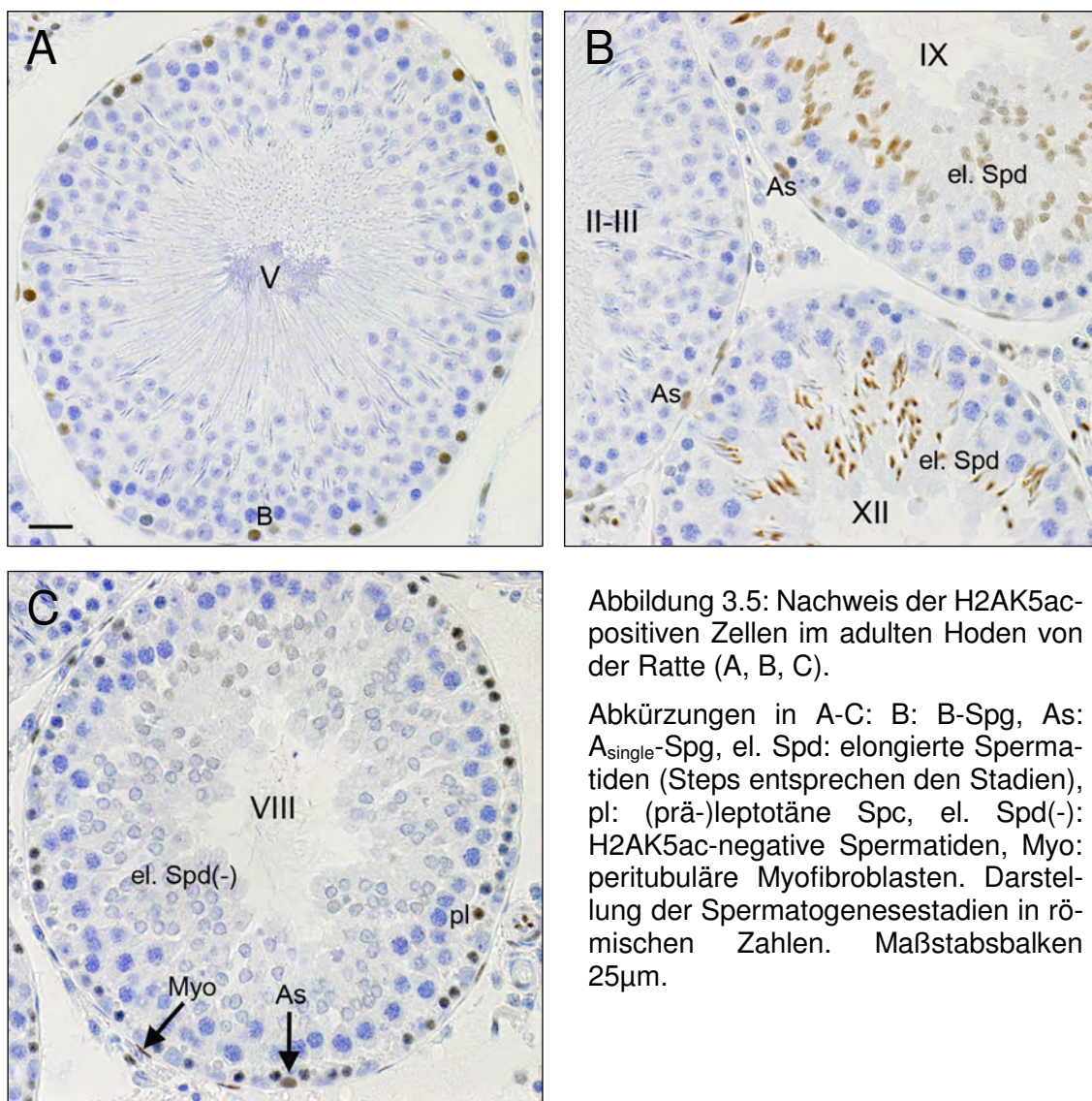


Abbildung 3.5: Nachweis der H2AK5ac-positiven Zellen im adulten Hoden von der Ratte (A, B, C).

Abkürzungen in A-C: B: B-Spg, As: A<sub>single</sub>-Spg, el. Spd: elongierte Spermatiden (Steps entsprechen den Stadien), pl: (prä-)leptotäne Spc, el. Spd(-): H2AK5ac-negative Spermatiden, Myo: peritubuläre Myofibroblasten. Darstellung der Spermatogenesestadien in römischen Zahlen. Maßstabsbalken 25µm.

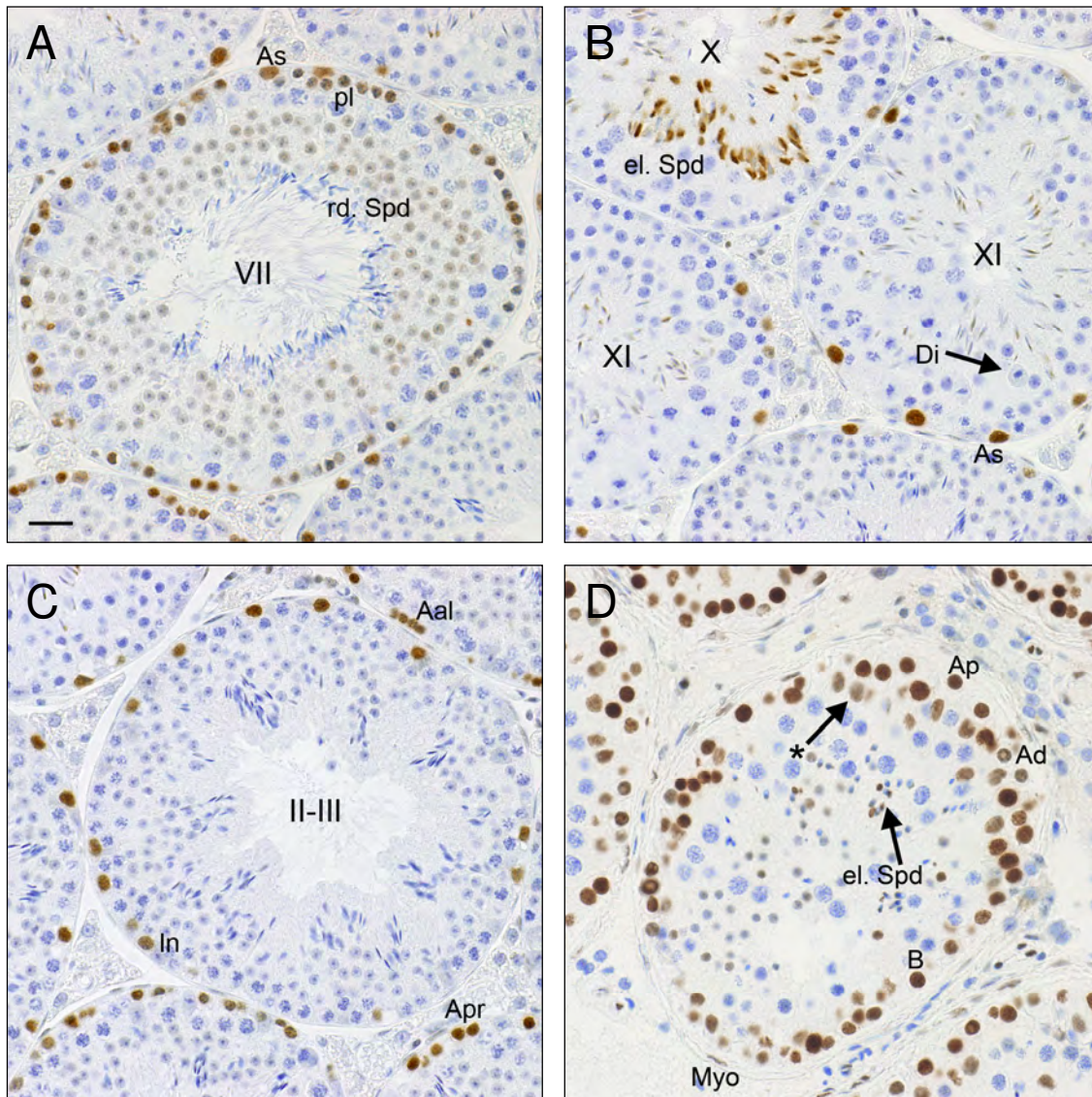


Abbildung 3.6: Nachweis der H2AK5ac-positiven Zellen im adulten Hoden der Maus (A-C) und des Menschen (D).

Abkürzungen in A-D: As: A<sub>single</sub>-Spg, pl: (prä-)leptotäne Spc, rd. Spd: runde Spermatiden (Steps entsprechen den Stadien), el. Spd: elongierte Spermatiden, Di: Diakinese, Apr: A<sub>paired</sub>-Spg, Aal: A<sub>aligned</sub>-Spg, In: In-Spg. Ad: A<sub>dark</sub>, Ap: A<sub>pale</sub>, B: B-Spg, \*: Sertoli-Zellkern, Myo: peritubuläre Myofibroblasten. Darstellung der Spermatogenesestadien in römischen Zahlen. Maßstabsbalken 25µm.

### 3.1.2.2 $\gamma$ H2A.X als Meiose-Marker in der Spermatogenese

Die Phosphorylierung des Histons H2A.X wurde in der Literatur in Spermatogonien, Spermatozyten und Spermatiden beschrieben (Hamer et al., 2003) und zeigt unter anderem meiotische Doppelstrangbrüche an (Mahadevaiah et al., 2001). Aufgrund der langandauernden Expression im Verlauf der Spermatogenese und der Möglichkeit einer Markierung von Doppelstrangbrüchen, die sich zu Beginn der Meiose ereignen, war dieser Marker sowohl für die Serienuntersuchung mit humanem Gewebe als auch für den direkten Speziesvergleich von Interesse.

$\gamma$ H2A.X (Cell Signaling) markierte im adulten Rattenhoden (prä-)leptotäne Spermatozytenzellkernen ab Stadium VIII blass (s. Abbildung 3.7 A). In lepto- und zygotänen Spermatozyten (Stadium IX bis XIII) ließ sich durch den Marker mehr phosphoryliertes Histon H2A.X nachweisen, da diese Keimzellentwicklungsstufen intensiv gefärbt waren (s. Abbildung 3.7 A, C). Ab dem Übergang zu den pachytänen Spermatozyten war das Expressionsmuster nur noch in den Sex-Vesikeln pachytäner Spermatozyten bis Stadium XII zu finden (s. Abbildung 3.7 A-C). Postmeiotisch wurde  $\gamma$ H2A.X in elongierten Step 10-11 Spermatiden (Stadium X-XI) detektiert (s. Abbildung 3.7 A, C). Das Expressionsmuster von  $\gamma$ H2A.X der Maus entsprach dem der Ratte (s. Abbildung 3.8), mit der Ergänzung, dass bei der Maus auch in B-Spg phosphoryliertes H2A.X detektiert werden konnte und die frühesten  $\gamma$ H2A.X-positiven elongierten Spermatiden undifferenzierter waren (VIII-X, s. Abbildung 3.8 C).

Im humanen Hoden konnte durch den Marker eine Phosphorylierung von H2A.X ab leptotänen Spermatozyten nachgewiesen werden (s. Abbildung 3.9 A). Wie im Nagetierhoden verschwand die nukleäre Färbung ab dem Zygotän-Pachytän-Übergang und  $\gamma$ H2A.X ließ sich nur noch in Sex-Vesikeln pachytäner Spermatozyten (Stadium I-V) detektieren. Des Weiteren konnte der Marker eine nukleäre Phosphorylierung von H2A.X in frühen Step 4 Spermatiden (Stadium IV) anzeigen (s. Abbildung 3.9 A). Für die Serienanalyse konnte der Marker aufgrund seines nur schwachen Signals in humanen, meiotischen Keimzellen jedoch nicht genutzt werden.

Da Anti- $\gamma$ H2A.X bereits als Meiose-Indikator in Zellkultur-Experimenten genutzt wurde (Eguizabal et al., 2011), wurde in der vorliegenden Studie zusätzlich ein Anti- $\gamma$ H2A.X eines anderen Herstellers (Millipore) überprüft. Die Ergebnisse für Ratte und Maus waren identisch mit den bereits für  $\gamma$ H2A.X (Cell Signaling) beschriebenen. Für den humanen Hoden zeigte der Antikörper von Millipore jedoch ein anderes Muster, da dieser  $\gamma$ H2A.X zytoplasmatisch in einigen A<sub>dark</sub>, A<sub>pale</sub> und B-Spermatogonien sowie vereinzelt Step 4 Spermatiden detektierte. Insgesamt zeigte dieser Marker im humanen Gewebe trotz mehrmaliger Wiederholung der Immunhistochemie ein schlechtes Signal-Rausch-



Verhältnis bzw. unspezifische Färbungen (s. Abbildung 3.9 B), weshalb der Marker von Millipore nicht für den Speziesvergleich genutzt wurde.

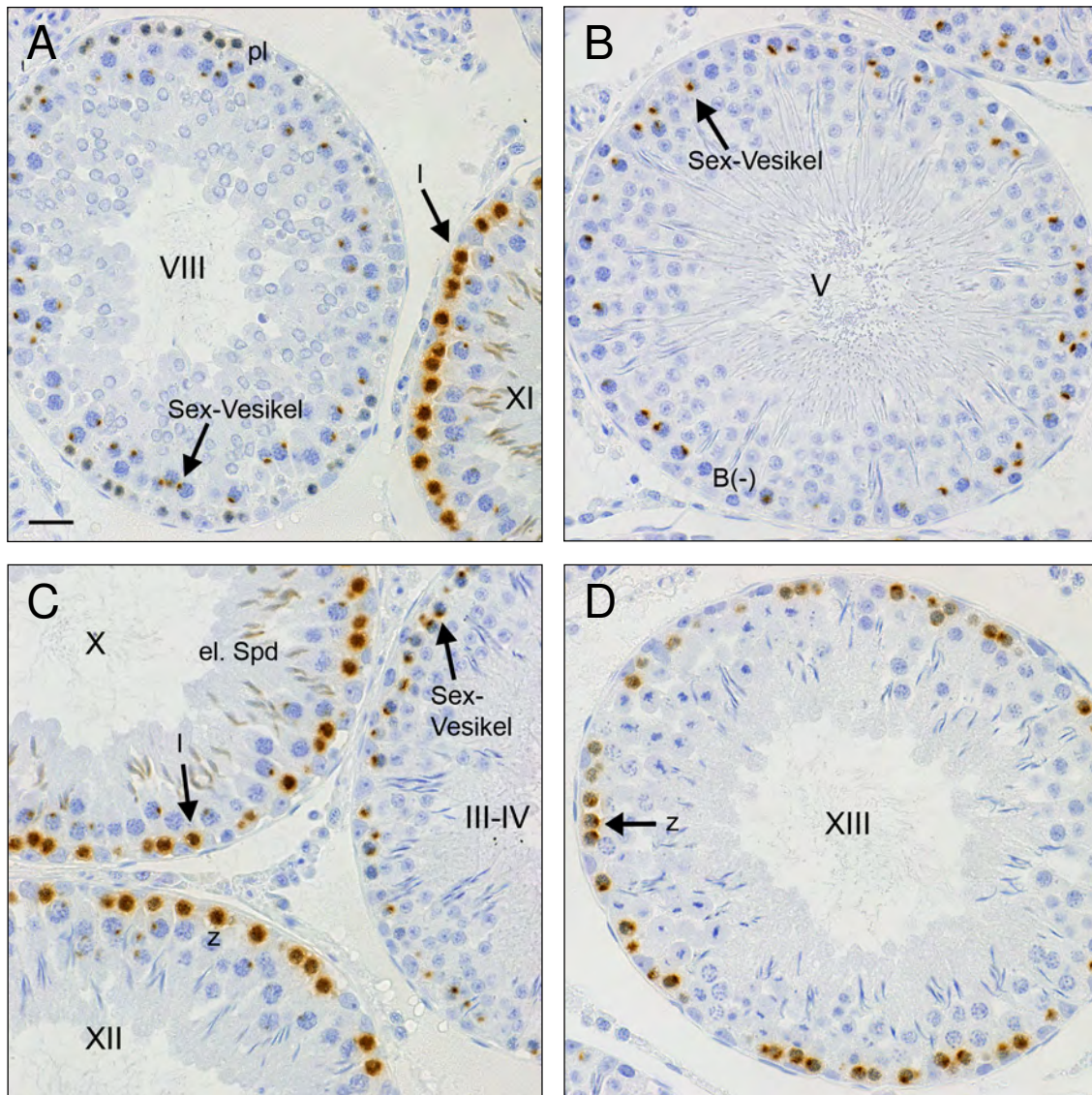


Abbildung 3.7: Nachweis der  $\gamma$ H2A.X (Cell Signaling)-positiven Zellen im adulten Hoden der Ratte (A-D).

Abkürzungen in A-D: pl: (prä-)leptotäne Spc, I: leptotäne Spc, B(-):  $\gamma$ H2A.X-negative B-Spg, z: zygotäne Spc, el. Spd: elongierte Spermatozyten (Steps entsprechen den Stadien). Darstellung der Spermatogenesestadien in römischen Zahlen. Maßstabsbalken 25 $\mu$ m.

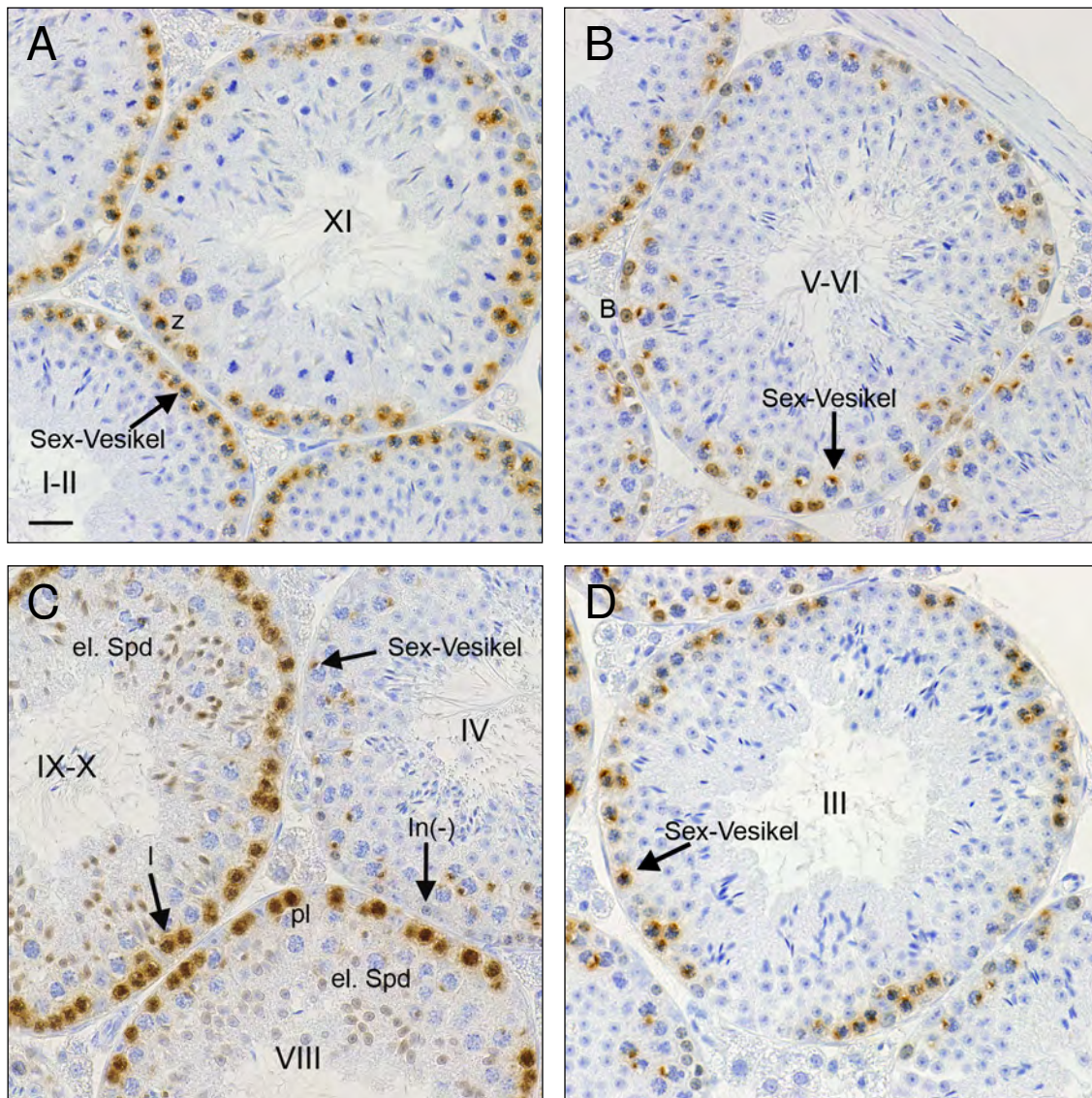


Abbildung 3.8: Nachweis der  $\gamma$ H2A.X (Cell Signaling)-positiven Zellen im adulten Hoden der Maus (A -D).

Abkürzungen in A-D: z: zygotäne Spc, B: B-Spg, In(-):  $\gamma$ H2A.X-negative In-Spg, pl: (prä-)leptotäne Spc, I: leptotäne Spc, el. Spd: elongierte Spermatiden (Steps entsprechen den Stadien). Darstellung der Spermatogenese-stadien in römischen Zahlen. Maßstabsbalken 25 $\mu$ m.



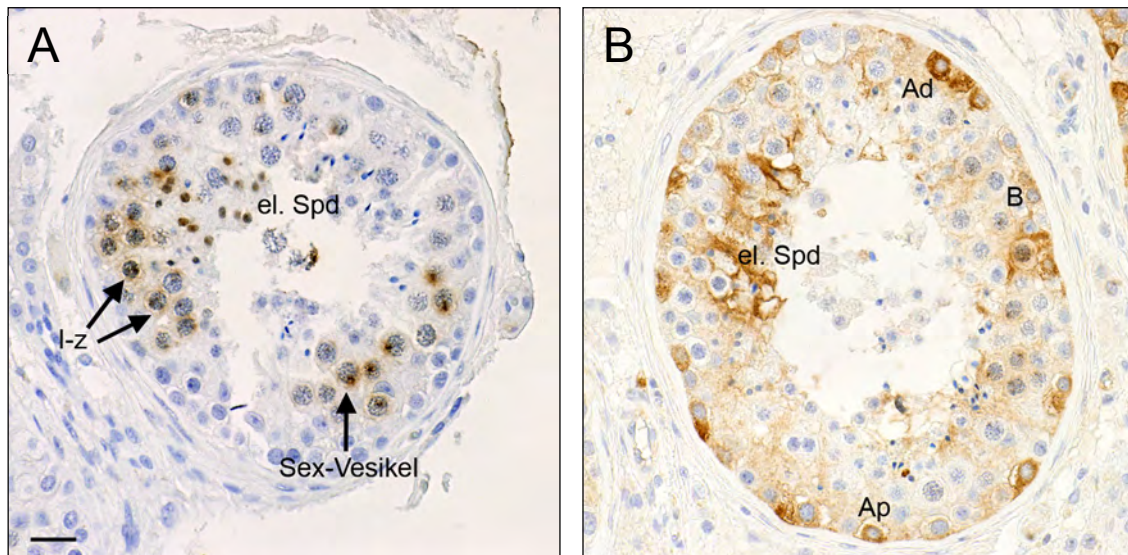


Abbildung 3.9: Nachweis der  $\gamma$ H2A.X (Cell Signaling)-positiven Zellen im adulten Hoden des Menschen (A) und  $\gamma$ H2A.X (Millipore) im humanen Hodengewebe (B).

Abkürzungen in A und B: I-z: lepto- bis zygotäne Spc, elongierte Spermatiden, B: B-Spg, Ad: A<sub>dark</sub>-Spg, Ap: A<sub>pale</sub>-Spg. Maßstabsbalken 25 $\mu$ m.

### 3.2 Evaluation der Expressionsmuster in verschiedenen Spezies

Bei der Auswahl der Marker wurden Proteine ausgesucht, die zusammen fast alle Phasen der Keimzellentwicklung abdecken, um den Spermatogeneseprozess im gesamten Verlauf evaluieren zu können. SPOC1, GILZ und H2AK5ac sind Marker von Spermatogonien und der Prophase der Meiose. MYBL1 und  $\gamma$ H2A.X werden kurz vor oder während der meiotischen Reifeteilung erstmals exprimiert und markieren auch Entwicklungsstufen der Spermiogenese. Für die späten Phasen der Spermatogenese wurden die Expression von ACE sowie das Wiederauftreten von H2AK5ac und  $\gamma$ H2A.X untersucht.

Der direkte Vergleich der Proteinexpressionsmuster zeigte auf, dass zwei der untersuchten Proteine (ACE, MYBL1) in Ratte, Maus und Mensch in gleichen Differenzierungsstadien lokalisiert sind, während sich für SPOC1, GILZ, H2AK5ac und  $\gamma$ H2A.X geringe Differenzen im zeitlichen Auftreten identifizieren ließen. Besonders bei den Spermatogonien zeigten sich in der vorliegenden Studie Differenzen zwischen den Spezies. Die Spermatogenese ist demnach als weitestgehend, aber nicht vollständig übereinstimmend zu beschreiben.

Zusätzlich wurde durch die Analyse deutlich, dass sich während der Spermatogenese komplexe Prozesse von Proteinregulierungen abspielen und diese, beispielsweise Histonmodifikationen, in teilweise sehr kurzen Abständen „hoch- und runterreguliert“ werden können. Auf die Funktion dieser Modifikationen und die Relevanz der kurzzeitigen Proteinregulierung wird in Kapitel 4.1.5 eingegangen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Expression der untersuchten Proteine in der Spermatogenese von adulten Ratten, Mäusen und im humanen Hoden weitestgehend ähnlich ist (s. Abbildung 3.10). Die hier aufgezeigten Differenzen im Auftreten von Proteinen während der Keimzellreifung verschiedener Spezies sind jedoch für in-vitro-Studien relevant. Wenn die Zellselektion mit Hilfe von spezifischen Markern erfolgt, sollte aufgrund der möglichen Unterschiede eine Überprüfung der Proteinexpression für die entsprechende Spezies erfolgen.



### 3.3 Serienuntersuchung mit humanem Gewebe

Eine vorangegangene Studie konnte zeigen, dass Patienten mit beeinträchtigter Spermatogenese im Vergleich zu Patienten mit histologisch normaler Spermatogenese eine verminderte Anzahl an spermatogonialen Stammzellen, Spermatogonien, Spermatiden und Sertoli-Zellen aufweisen (Hentrich et al., 2011). Um mögliche Ursachen für die männliche Infertilität zu differenzieren, sollte der dynamische Vorgang der Spermatogenese in dieser Arbeit mit weiteren Protein-Markern erfasst werden. Für die Auswertung der frühen Spermatogenesestadien der drei Patientenkollektive (NSP, HYP, SZA) mit je 30 Patienten wurden die beiden Proteine OCT2 und SAGE1 ausgewählt. Zur Identifikation von Zellen, die im Differenzierungsprozess schon weiter fortgeschritten sind, wurde die Expression des Proteins SMAD3 genutzt.

#### 3.3.1 OCT2, ein Marker früher Spermatogonien

Das Protein OCT2 (octamer binding protein 2; POU2F2) wurde im humanen Hodengewebe in spermatogonialen Reservestammzellen beschrieben (Lim et al., 2011). Um Anti-OCT2 für die Serienauswertung früher Spermatogenesestadien zu verwenden, wurde die Reproduzierbarkeit der publizierten Ergebnisse überprüft.

Das Protein konnte in der vorliegenden Studie nur im menschlichen Hodengewebe detektiert werden, die Nagetierpräparate zeigten keine Proteinexpression. OCT2 war in den Zellkernen der  $A_{\text{dark}}$ - und  $A_{\text{pale}}$ -Spermatogonien lokalisiert, wobei der Anti-OCT2 deutlich mehr  $A_{\text{dark}}$  markierte (s. Abbildung 3.11).

Bemerkenswert ist, dass nicht alle in den Tubuli erkennbaren  $A_{\text{dark}}$  und  $A_{\text{pale}}$  OCT2-positiv waren. Es fanden sich auch zahlreiche OCT2-negative  $A_{\text{dark}}$  und  $A_{\text{pale}}$  (s. Abbildung 3.11). Aus dem Nebeneinander von OCT2-positiven und OCT2-negativen spermatogonialen Stammzellen lässt sich folgern, dass OCT2 nur in einer Untergruppe der Spermatogonien mit Stammzellcharakter exprimiert wird. Weiterhin war auffällig, dass die OCT2-positiven Spermatogonien nicht gleichmäßig an der Basalmembran der Tubulusquerschnitte verteilt, sondern häufig in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander und in der Nähe zum Gefäßsystem des Hodens zu finden waren (s. Abbildung 3.11). Diese Charakteristik wurde in der Literatur unter dem Begriff der Stammzellnische im Nagetierhoden beschrieben (s. Kapitel 1.3.4). Aufgrund der genannten Merkmale diente OCT2 als Marker für eine Subpopulation früher Spermatogonien bzw. Stammzellen.

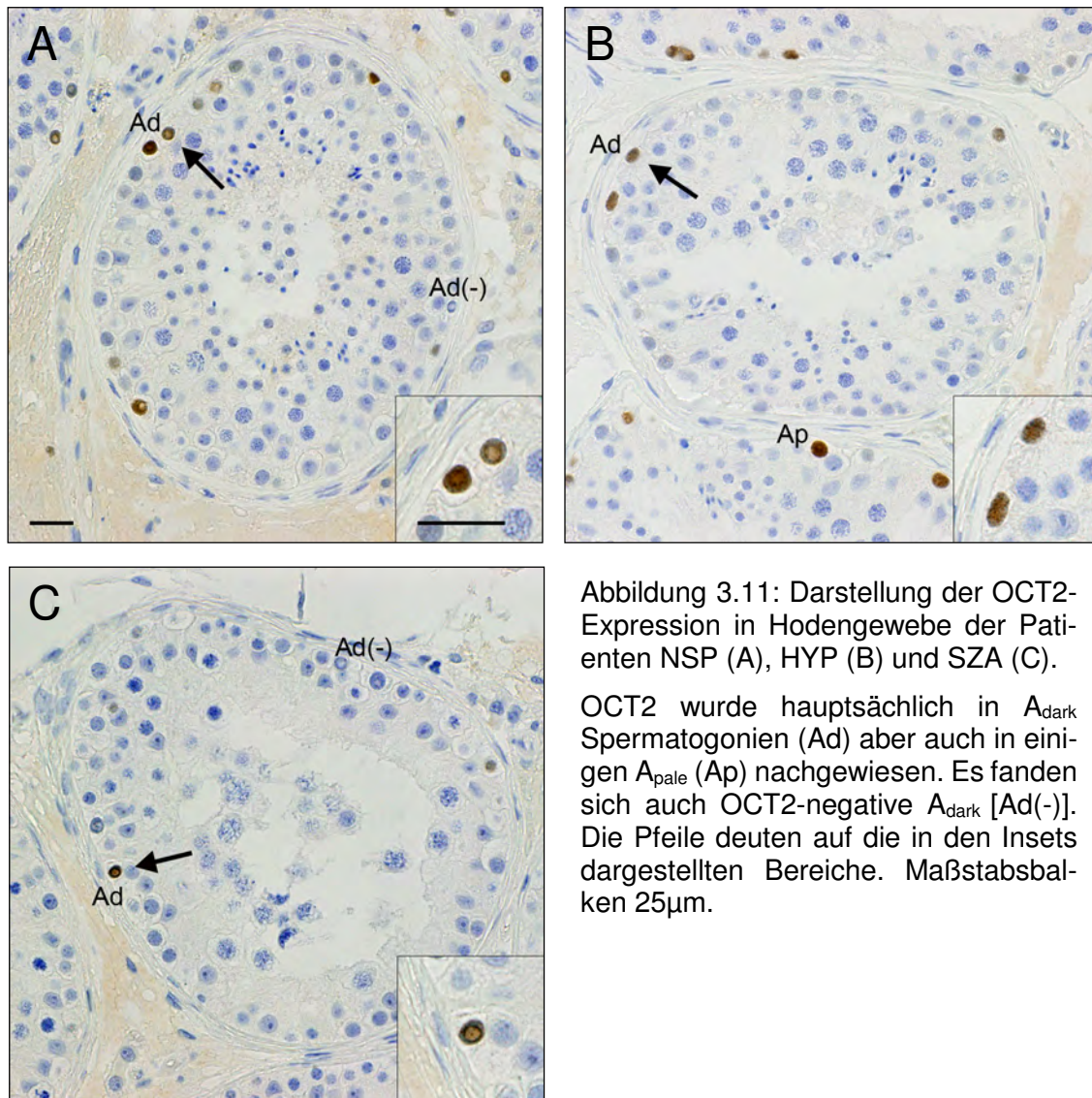


Abbildung 3.11: Darstellung der OCT2-Expression in Hodengewebe der Patienten NSP (A), HYP (B) und SZA (C).

OCT2 wurde hauptsächlich in  $A_{\text{dark}}$  Spermatogonien (Ad) aber auch in einigen  $A_{\text{pale}}$  (Ap) nachgewiesen. Es fanden sich auch OCT2-negative  $A_{\text{dark}}$  [Ad(-)]. Die Pfeile deuten auf die in den Insets dargestellten Bereiche. Maßstabsbalken 25µm.

### 3.3.2 SAGE1 als Marker für sich differenzierende Spermatogonien und den Mitose-Meiose-Übergang

Lim et al. (2011) beschrieben ein weiteres Protein, SAGE1 (sarcoma antigen 1), das von mitotischen Spermatogonien exprimiert wird. In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob der Marker Anti-SAGE1 neben mitotischen Spermatogonien auch Zellen während des Mitose-Meiose-Übergangs markiert.

Wie OCT2 konnte auch SAGE1 ausschließlich im humanen Hodengewebe detektiert werden. Das Protein war in Nuklei der Spermatogonien  $A_{\text{dark}}$ ,  $A_{\text{pale}}$ , B und der (prä-)leptotänen Spermatozyten sowie in einem Teil der runden Spermatisden nachweisbar (s. Abbildung 3.12).

Lichtmikroskopisch ließen sich jedoch nur vereinzelt gefärbte  $A_{\text{dark}}$  im Tubulusquerschnitt



finden. Die Mehrzahl der  $A_{\text{dark}}$  Spermatogonien war nicht markiert, so dass sich annehmen lässt, dass SAGE1 nur von einer  $A_{\text{dark}}$ -Untergruppe exprimiert wird. Die  $A_{\text{pale}}$  und B Spermatogonien hingegen wiesen fast alle eine Markierung auf (s. Abbildung 3.12). SAGE1 war auch in mitotischen Spermatogonien exprimiert, die wegen der Auflösung der Kernhülle zytoplasmatisch gefärbt waren (s. Abbildung 2.3, Kapitel 2.2.3). Durch die Markierung (prä-)leptotäner Spermatozyten wurden durch SAGE1 zusätzlich Zellen während des Mitose-Meiose-Übergangs erfasst (s. Abbildung 3.12 B). Außerdem konnte eine Expression des SAGE1 Proteins auch in einigen runden Spermatiden (Stadium II-III) festgestellt werden (s. Abbildung 3.12 A). Diese ließen sich jedoch gut von den Spermatogonien und frühen Spermatozyten unterscheiden, so dass der Marker für die Serienauswertung der sich differenzierenden Keimzellen und den Mitose-Meiose-Übertritt geeignet war.

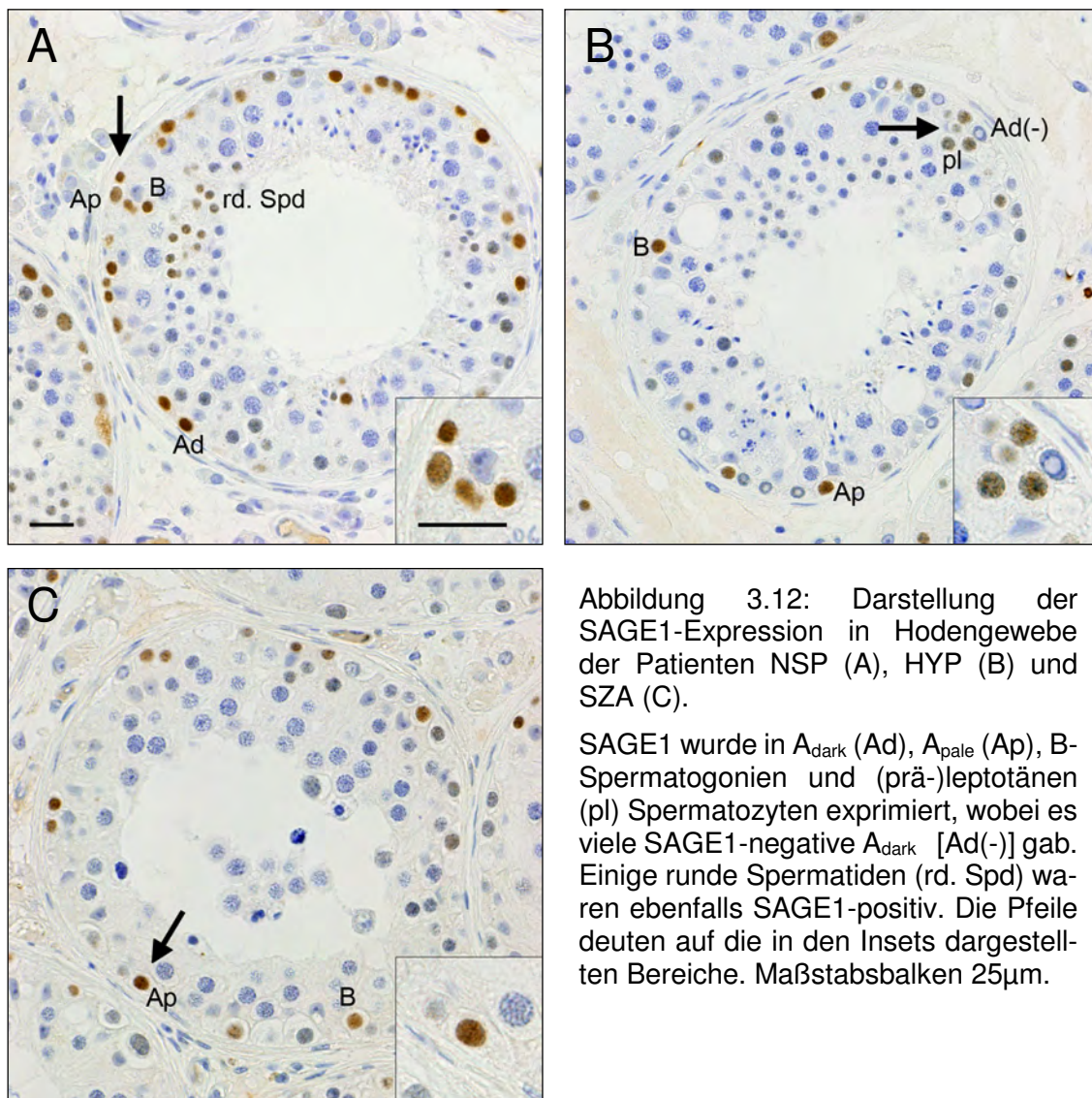


Abbildung 3.12: Darstellung der SAGE1-Expression in Hodengewebe der Patienten NSP (A), HYP (B) und SZA (C).

SAGE1 wurde in  $A_{\text{dark}}$  (Ad),  $A_{\text{pale}}$  (Ap), B-Spermatogonien und (prä-)leptotänen (pl) Spermatozyten exprimiert, wobei es viele SAGE1-negative  $A_{\text{dark}}$  [Ad(-)] gab. Einige runde Spermatiden (rd. Spd) waren ebenfalls SAGE1-positiv. Die Pfeile deuten auf die in den Insets dargestellten Bereiche. Maßstabsbalken 25µm.



### 3.3.3 SMAD3 als Marker für Spermatozyten in der Meiose

Das SMAD3-Signalprotein wurde im Zytoplasma von meiotischen Keimzellen und runden Spermatiden adulter Ratten (Xu et al., 2003) und Mäusen (Itman et al., 2011) detektiert. Da der verwendete Marker bereits von Hentrich et al. (2011) im Hodengewebe von Ratte, Maus und Mensch evaluiert wurde, konnten die Resultate der Immunhistochemie direkt verglichen werden.

In der hier durchgeführten Serienuntersuchung war SMAD3 im menschlichen Hoden in pachytänen Spermatozyten der Stadien I-V zytoplasmatisch nachweisbar (s. Abbildung 3.13). Zudem konnte SMAD3 in wenigen runden Spermatiden (Stadium I) identifiziert werden (nicht gezeigt). Anzumerken ist, dass Anti-SMAD3 auch Sertoli-Zellkerne blass und deren perinukleären Saum deutlich färbte. Des Weiteren war SMAD3 auch vereinzelt in den Zellkernen von Spermatogonien (A<sub>pale</sub> und B) lokalisiert (s. Abbildung 3.13 A und B). Ein wichtiger Aspekt für die Serienauszählung war, dass ca. 10% der pachytänen Spermatozyten bei Patienten mit fehlerhafter Spermatogenese keine SMAD3-Expression zeigten, wohingegen im Hoden mit histologisch normaler Spermatogenese fast alle dieser Zellen markiert waren. Aufgrund der gut identifizierbaren Lokalisation im Zytoplasma pachytäner Spermatozyten konnte SMAD3 als Marker für das zentrale Meiosestadium benutzt werden.

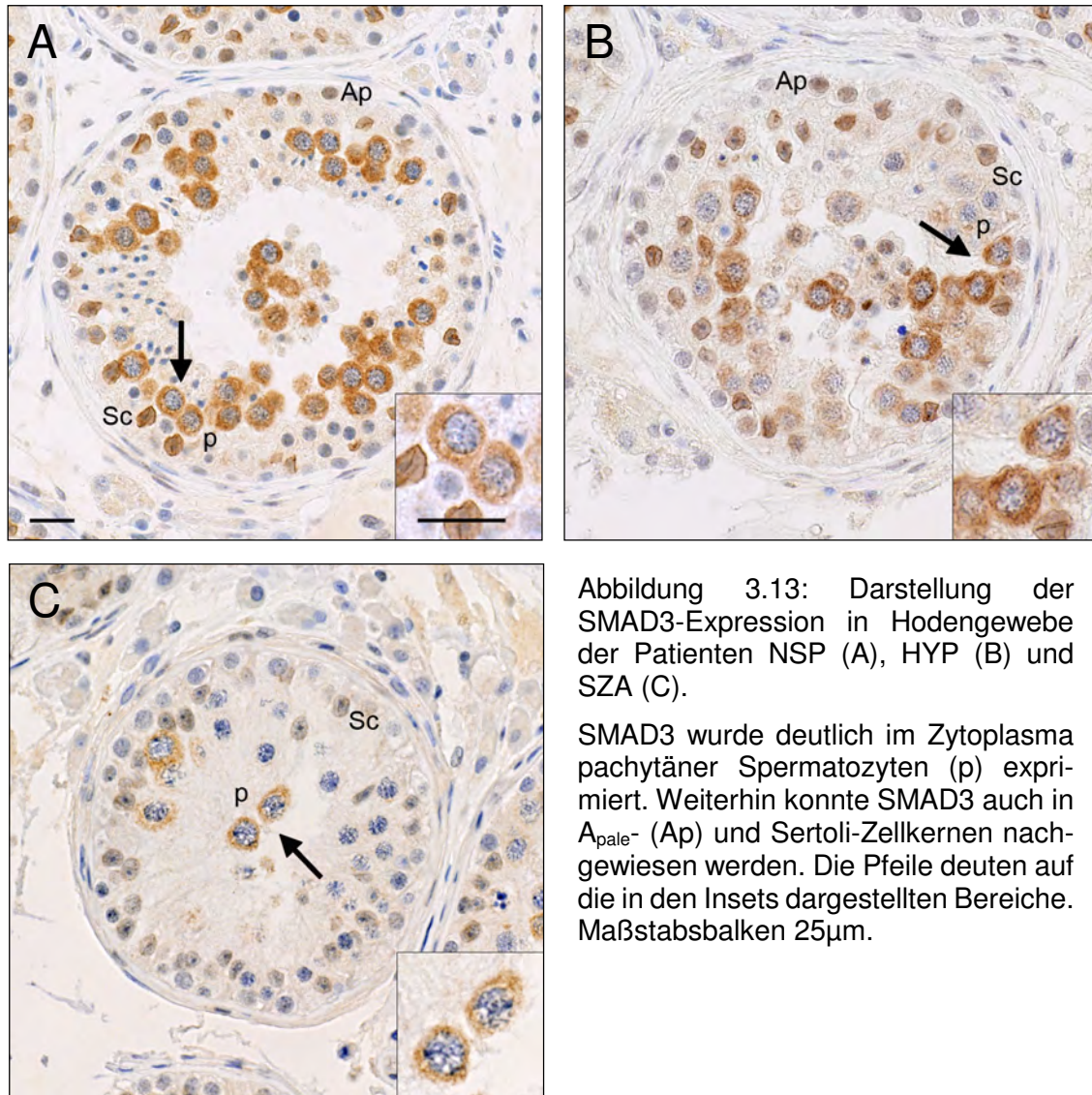


Abbildung 3.13: Darstellung der SMAD3-Expression in Hodengewebe der Patienten NSP (A), HYP (B) und SZA (C).

SMAD3 wurde deutlich im Zytoplasma pachytäner Spermatozyten (p) exprimiert. Weiterhin konnte SMAD3 auch in  $A_{pale}$ - (Ap) und Sertoli-Zellkernen nachgewiesen werden. Die Pfeile deuten auf die in den Insets dargestellten Bereiche. Maßstabsbalken 25µm.

### 3.3.4 Auswertung der Serienuntersuchung mit NSP-, HYP- und SZA-Patienten

#### 3.3.4.1 Quantifizierung der frühen bis mittleren Phase der Keimzellentwicklung und Vergleich der Patientengruppen

##### OCT2-positive Spermatogonien im humanen Hoden

Der Marker OCT2, der in  $A_{\text{dark}}$ - und  $A_{\text{pale}}$ -Subpopulationen exprimiert wird, wurde für die Quantifizierung der frühen Spermatogonien in den drei Patientenkollektiven NSP, HYP und SZA benutzt, die jeweils 30 Patienten beinhalteten. Die Auszählung der OCT2-positiven Zellen ergab für die Gruppe der NSP einen Mittelwert von  $2,09 \pm 0,25$  Stammzellen pro Tubulusquerschnitt (s. Abbildung 3.14). Die Patienten mit Hypospermatogenese hatten durchschnittlich  $2,05 \pm 0,23$  OCT2-positive Zellen pro Tubulusquerschnitt (s. Abbildung 3.14). Die Spermatozytenarrest-Patienten kamen auf einen Mittelwert von  $0,96 \pm 0,16$  (s. Abbildung 3.14).

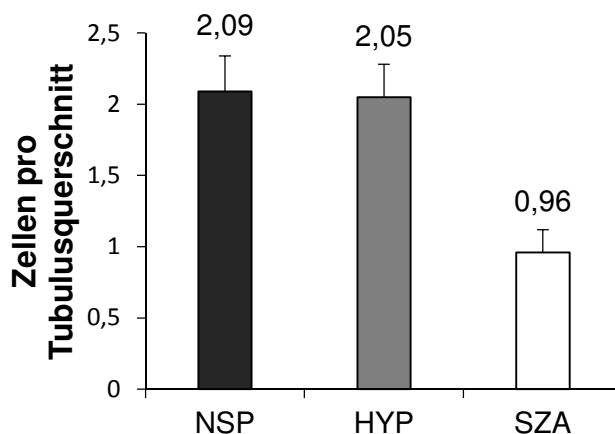


Abbildung 3.14: Mittelwerte der OCT2-positiven frühen Spermatogonien pro Tubulusquerschnitt  $\pm$  SEM von 30 Patienten pro Gruppe. NSP: Normale Spermatogenese, HYP: Hypospermatogenese, SZA: Spermatozytenarrest.

##### SAGE1-positive Zellen im humanen Hoden

Für alle Patienten wurden weiterhin die SAGE1-positiven Spermatogonien und (prä-)leptotänen Spermatozyten ausgezählt. Die Auswertung ergab für die NSP-Patienten einen Mittelwert von  $15,62 \pm 0,82$  Keimzellen pro Tubulusquerschnitt (s. Abbildung 3.15). Die Gruppe mit Hypospermatogenese hatten durchschnittlich  $11,16 \pm 0,61$  SAGE1-positive Zellen pro Tubulusquerschnitt (s. Abbildung 3.15). Die SZA-Gruppe kam auf einen Mittelwert von  $9,10 \pm 0,77$  (s. Abbildung 3.15). Die wenigen gefärbten runden Spermatischen wurden in der Auszählung nicht berücksichtigt.

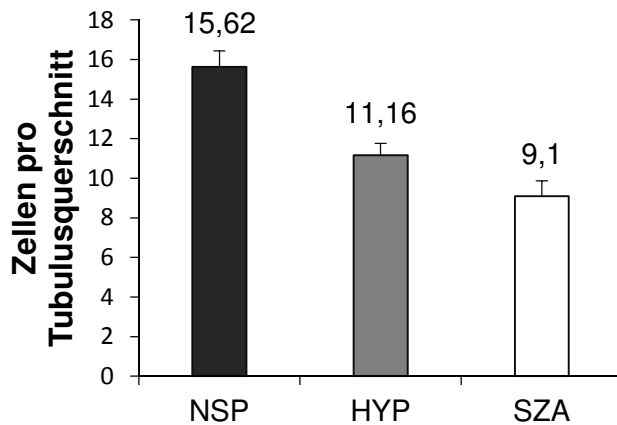


Abbildung 3.15: Mittelwerte der SAGE1-positiven Spermatogonien und frühen Spermatozyten pro Tubulusquerschnitt  $\pm$  SEM von 30 Patienten pro Gruppe. NSP: Normale Spermatogenese, HYP: Hypospermatogenese, SZA: Spermatozytenarrest.

### SMAD3-positive Spermatozyten im humanen Hoden

Mittels SMAD3 ließen sich pachytäne Spermatozyten in den verschiedenen Patientengruppen quantifizieren. Dieses Protein wurde bei NSP-Patienten in durchschnittlich  $16,35 \pm 0,92$  Spermatozyten pro Tubulusquerschnitt detektiert (s. Abbildung 3.16). Für die HYP-Gruppe errechnete sich ein Mittelwert von  $8,64 \pm 0,56$  SMAD3-positiven Zellen (s. Abbildung 3.16). Bei den SZA-Patienten, die histologisch einen Arrest in pachytänen Spermatozytenstadien aufweisen, konnten  $1,53 \pm 0,36$  SMAD3-exprimierende Spermatozyten pro Tubulusquerschnitt ausgezählt werden (s. Abbildung 3.16).

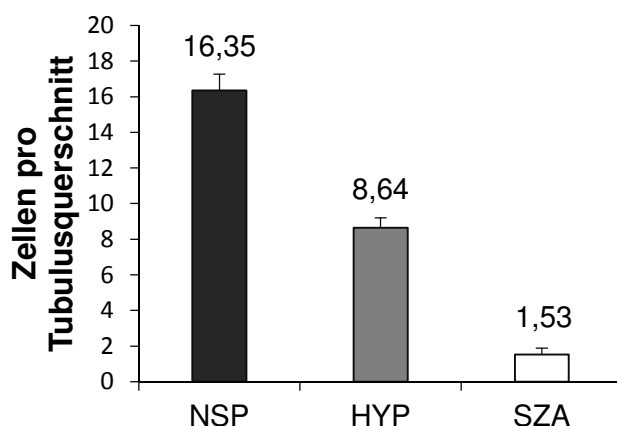


Abbildung 3.16: Mittelwerte der SMAD3-positiven pachytänen Spermatozyten pro Tubulusquerschnitt  $\pm$  SEM von 30 Patienten pro Gruppe. NSP: Normale Spermatogenese, HYP: Hypospermatogenese, SZA: Spermatozytenarrest.

Zur statistischen Auswertung wurden die Mittelwerte der Patienten durch den F-Test auf Normalverteilung getestet und als nicht normalverteilt identifiziert. Die Überprüfung auf Signifikanz der Ergebnisse wurde deshalb mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Rangtest für unabhängige Stichproben durchgeführt.

Die Analyse der Werte für die OCT2-positiven Stammzellen der SZA-Patienten ergab eine signifikante ( $p < 0,01$ ) Reduktion um 54,1% verglichen mit den Patienten mit histologisch normaler Spermatogenese. Ebenso ließen sich SZA-Patienten signifikant von der HYP-Gruppe abgrenzen. Es stellte sich eine Zellzahlreduktion um 53,2% heraus ( $p < 0,001$ ). Zwischen den NSP- und den HYP-Patienten gab es einen nicht signifikanten Unterschied in der Anzahl der Stammzellen von 1,9% (s. Tabelle 3.1).

Für SAGE1 konnte beim Vergleich von NSP mit HYP eine signifikante Reduktion ( $p < 0,01$ ) der Zellzahlen um 28,5 % bei den Patienten mit Hypospermatogenese festgestellt werden. Bei den SZA-Patienten verringerte sich die Anzahl der SAGE1-positiven Zellen im Vergleich mit NSP etwas mehr (41,7%,  $p < 0,001$ ). Zwischen den HYP- und den SZA-Patienten konnte eine nicht signifikante Reduktion der Zellzahl pro Tubusquerschnitt von 18,4% für die SZA-Patienten ermittelt werden (s. Tabelle 3.1).

Die Auswertung von SMAD3 ergab, dass sich die Spermatozytenzahlen von NSP zu HYP und vor allem zu SZA signifikant verringerte. Von den Gruppen NSP zu HYP reduzierte sich die Anzahl der SMAD3-positiven Zellen um 47,2%. Die NSP-Patienten ließen sich deutlich von den SZA-Patienten abgrenzen und zeigten eine Reduktion der Zellzahl um 90,6%. Beim Vergleich von SZA-Patienten mit HYP-Patienten stellte sich eine Reduktion an SMAD3-positiven Spermatozyten von 82,2% bei den SZA-Patienten heraus. Die Signifikanzniveaus zur Unterscheidung der Gruppen hatten bei allen Vergleichen für SMAD3 einen  $p$ -Wert  $< 0,001$  (s. Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Auswertung der Reduktion von Spermatogonien und Spermatozyten bei NSP, HYP und SZA.

	OCT2			SAGE1			SMAD3		
	<b>Frühe Spermatogonien</b>			<b>differenzierende Spermatogonien / (prä-)leptotäne Spermatozyten</b>			<b>Pachytäne Spermatozyten</b>		
	NSP	HYP	SZA	NSP	HYP	SZA	NSP	HYP	SZA
Mittelwert	2,09	2,05	0,96	15,62	11,16	9,10	16,35	8,64	1,53
SEM	0,25	0,23	0,16	0,82	0,61	0,77	0,92	0,56	0,36
n	30	30	30	30	30	30	30	30	30
<b>p-Wert</b>									
NSP vs HYP	ns			0,01			0,001		
NSP vs SZA	0,01			0,001			0,001		
HYP vs SZA	0,001			ns			0,001		
<b>Zellzahl-reduktion</b>	<b>in %</b>			<b>in %</b>			<b>in %</b>		
NSP vs HYP	2			29			47		
NSP vs SZA	54			42			91		
HYP vs SZA	53			18			82		

ns: nicht signifikant, vs: versus

### 3.3.4.2 Festlegung der Grenzwerte

Mittels der ROC-Analyse (Receiver-Operating-Characteristics-Analyse) sollte geklärt werden, ob zwischen zwei Zuständen, wie z.B. „Gesund“ und „Krank“, signifikant unterschieden werden kann. Dabei wurden für die OCT2-, SAGE1- und SMAD3-positiven Spermatogonien bzw. Spermatozyten pro Tubulusquerschnitt Grenzwerte (Cut-Offs) bestimmt und anhand des ROC-Diagramms für alle kalkulierten Cut-Offs die zugehörigen Werte für Sensitivität und Spezifität berechnet. Alle Werte größer oder gleich des Cut-Offs wurden folglich als NSP („normal“) betrachtet. Zusätzlich wurde zur Bestimmung der Trennschärfe der Cut-Offs die positive Likelihood-Ratio ( $LR^+$ , s. Kapitel 2.2.4) ermittelt, die verdeutlicht, wie gut sich der festgelegte Grenzwert dazu eignet, zwischen „gesund“ und „krank“ zu unterscheiden.

Die ROC-Analyse ergab einen Grenzwert von 1,06 OCT2-positiven Spermatogonien pro Tubulusquerschnitt. Beim Vergleich von NSP- mit SZA-Patienten betrug die positive Likelihood-Ratio für diesen Grenzwert 4,3, für die HYP- vs. SZA-Patienten 2,4 und für NSP vs. HYP 1,8. Alle Werte sind in Tabelle 3.2 dargestellt.

Für SAGE1-positive Zellen konnte mittels der ROC-Analyse ein Grenzwert von 10,84 positiven Zellen pro Tubulusquerschnitt bestimmt werden. Die positive Likelihood-Ratio betrug für NSP vs. HYP 4,0, für NSP vs. SZA 7,7 und für HYP vs. SZA 1,9. (s. Tabelle 3.2).

Als Grenzwert für SMAD3-positive Spermatozyten ergab sich anhand der ROC-Analyse ein Wert von 8,60 positiven Spermatozyten pro Tubulusquerschnitt. Für NSP vs. SZA resultierte daraus eine sehr hohe  $LR^+$  von 30,0 und für NSP vs. HYP 14,0. Der  $LR^+$ -Wert von HYP vs. SZA betrug 2,1. Die Werte sind in Tabelle 3.2 eingetragen.

Tabelle 3.2: Darstellung der Grenzwerte mit den zugehörigen Spezifitäten und Sensitivitäten sowie  $LR^+$ -Werte für OCT2, SAGE1, SMAD3.

	<b>OCT2-Daten</b> Cut-Off = 1,06			<b>SAGE1-Daten</b> Cut-Off = 10,84			<b>SMAD3-Daten</b> Cut-Off = 8,60		
	Sens.	Spez.	$LR^+$	Sens.	Spez.	$LR^+$	Sens.	Spez.	$LR^+$
HYP/NSP	23	87	1,8	40	90	4,0	47	97	14,0
SZA/NSP	57	87	4,3	77	90	7,7	100	97	30,0
SZA/HYP	57	77	2,4	77	60	1,9	100	53	2,1

Werte für Sensitivität (Sens.) und Spezifität (Spez.) in %.

### 3.3.4.3 Einteilung der Spermatogenesedefekte

Die bestehende histologische Einteilung der Spermatogenesedefekte durch Bergmann & Kliesch (1998, 2009) orientiert sich am Prozentsatz der Tubuli, die elongierte Spermatozyten aufweisen. In der vorliegenden Arbeit bildete diese Klassifikation nach der späten Phase der Spermatogenese die Grundlage für die Einteilung in die Gruppen NSP, HYP und SZA (s. Kapitel 1.4 und 1.5)

Ausgehend von der bestehenden Klassifikation sollten die Gruppen mit Markern gegen spezifische Proteine in den frühen Phasen der Spermatogenese untersucht werden, um möglicherweise vorhandene Unterschiede der Keimzellentwicklung bei den Patienten aufzuzeigen. Dazu erfolgte eine Evaluation der drei Entwicklungsphasen (s. Abbildung 3.17):

**Phase 1** wird repräsentiert durch die OCT2-positiven Spermatogonien („frühe Spermatogonien“).

**Phase 2** beinhaltet sich teilende und differenzierende Spermatogonien sowie frühe Spermatozyten am Übergang zur Meiose („Mitose/Differenzierung/Meiose-Übergang“).

**Phase 3** erfasst die Meiose-Leistung anhand der pachytänen Spermatozyten („Meiose-Effizienz“).

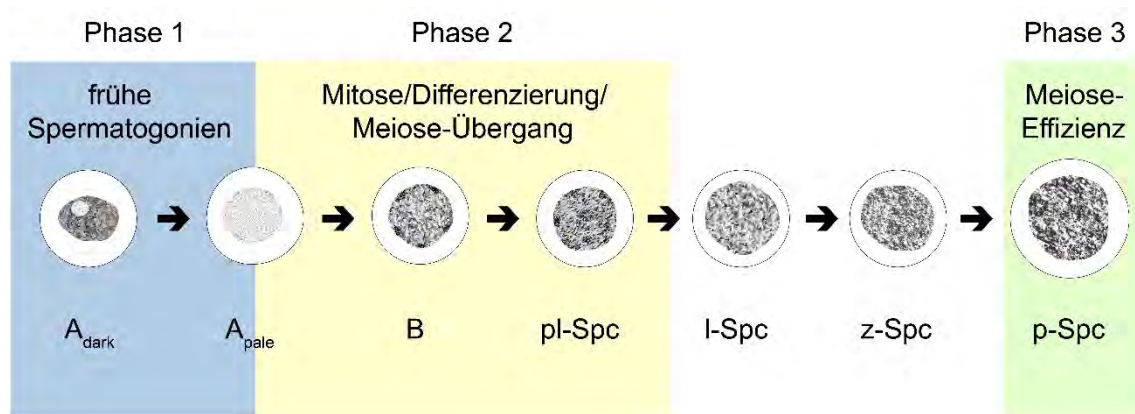


Abbildung 3.17: Darstellung der Spermatogenesestadien des humanen Hodens bis zu pachytänen Spermatozyten im zeitlichen Verlauf. Die für die Auswertung relevanten Phasen 1-3 sind farblich hervorgehoben.

Da der Mitose-Meiose-Übergang in der vorangegangenen Studie von Hentrich et al. (2011) nicht separat betrachtet wurde, war in dieser Arbeit, neben der ersten Phase, besonders die zweite Phase mit sich differenzierenden und mitotischen Spermatogonien sowie (prä-)leptotänen Spermatozyten von Interesse.

Den Ausgangspunkt der individuellen Klassifikation bildete Phase 3, anhand derer die Spermatogeneseleistung der Patienten in „hohe Meiose-Effizienz“ und „geringe Meiose-Effizienz“ gruppiert wurde. Beide Gruppen konnten entsprechend der Einzelwerte aus Phase 1 und 2 in vier Untergruppen unterteilt werden. Verteilungsmerkmale waren dabei die Grenzwerte der OCT2- und SAGE1-Auszählung, wobei „+“ oberhalb des Cut-Offs und „-“ unterhalb des Cut-Offs bedeutete. So ließen sich acht Untergruppen definieren:

#### **I. Gruppen mit hoher Meiose-Effizienz** (s. Abbildung 3.18 A)

1. Keine Defizite in Phase 1 und Phase 2
2. Hohe Meiose-Effizienz trotz niedriger Ausgangswerte in Phase 1
3. Hohe Meiose-Effizienz trotz bestehender Defizite in Phase 2
4. Hohe Meiose-Effizienz trotz kleiner Zellzahlen in Phase 1 und 2

#### **II. Gruppen mit geringer Meiose-Effizienz** (s. Abbildung 3.18 B)

5. Reine Meiosedefizite
6. Geringe Meiose-Effizienz und niedrige Ausgangswerte in Phase 1
7. Geringe Meiose-Effizienz und Defizite in Phase 2
8. Niedrige Zellzahlen in beiden Phasen der frühen Spermatogenese



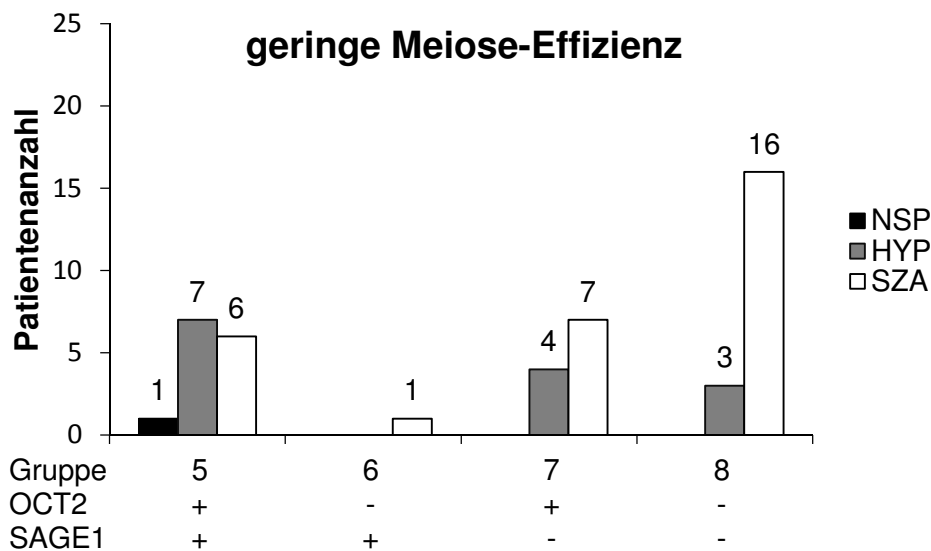
**A****B**

Abbildung 3.18: Gruppierung der Spermatogenesedefizite zur Patientenklassifikation. Einleitung der Patienten anhand der Cut-offs (s. Kapitel 3.3.4.2) in „hohe Meiose-Effizienz“ (A) und „geringe Meiose-Effizienz“ (B). Die beiden Gruppen bestehen aus vier Untergruppen mit einer normalen Zellanzahl in Phase 1 (OCT2 „+“) und Phase 2 (SAGE1 „+“) oder reduzierten Werten in Phase 1 (OCT2 „-“) und Phase 2 (SAGE1 „-“). Eine hohe Meiose-Effizienz zeigten nur NSP und HYP, die diese teilweise auch bei reduzierten Zellzahlen in Phase 1 und/oder Phase 2 erzielten (A). Alle SZA wiesen eine geringe Meiose-Effizienz auf und mehr als 50% hatten dabei gleichzeitig reduzierte Zellzahlen in Phase 1 und 2 (B).

#### 3.3.4.4 Individuelle Patientenanalyse

Durch die Einteilung in verschiedene Untergruppen ließ sich die frühe Spermatogenese der Patienten individuell analysieren. Es wurde deutlich, dass einzig NSP- ( $n = 29$ ) und HYP-Patienten ( $n = 14$ ) eine hohe Meiose-Effizienz mit normalen Zellzahlen in Phase 1 und/oder Phase 2 aufwiesen (s. Abbildung 3.18 A). Auffallend war, dass nur bei NSP (7 von 7) und HYP (7 von 14) trotz reduzierter Spermatogonien- oder (prä)leptotäner Spermatozytenzahlen eine hohe Meiose-Effizienz festgestellt werden konnte, weshalb meiotische Kompensationsmechanismen angenommen werden können. Im Gegensatz dazu hatten alle SZA-Patienten eine geringe Meiose-Effizienz, wobei bei mehr als der Hälfte der Patienten ( $n = 16$ ) in allen drei Phasen niedrige Zellzahlen zu finden waren (s. Abbildung 3.18 B). Hervorzuheben ist, dass die SZA-Patienten häufiger Defizite in der Mitose-/Differenzierungs/Meiose-Eintritts-Phase als reduzierte OCT2-positive Spermatogonienzahlen aufwiesen (7:1). Daraus lässt sich folgern, dass bei diesen Patienten vor allem mitotische Defizite, unabhängig von spermatogonialen Stammzelldefiziten, die Krankheitsausprägung beeinflussen.

Insgesamt sind Meiose-Defizite bei NSP eine Ausnahme (3%), während bei 47% der HYP- und 100% der SZA-Patienten ein Mangel von meiotischen, pachytänen SMAD3-positiven Spermatozyten feststellbar war. Vor allem Gruppe 5 (s. Abbildung 3.18 B) zeigt, dass auch primäre Meiose-Defizite trotz normaler Zellzahlen in den frühen Phasen vorliegen können.

Zusammenfassend ermöglicht die Einteilung eine detailliertere Untersuchung der frühen Spermatogenese bei Patienten mit Spermatogenesedefekten und stellt neue Aspekte prämeiotischer Defizite dar.

## 4 Diskussion

Diese Studie hatte das primäre Ziel, die Spermatogenese anhand von Markerproteinen zu evaluieren. Dafür sollten spezifische Entwicklungsstadien immunhistochemisch detektiert werden, um drei verschiedene Patientenkollektive mit unterschiedlich effizienter Spermienproduktion vergleichen zu können. Von besonderem Interesse waren Marker in frühen Stadien der Spermatogenese, die noch vor bzw. zu Beginn der ersten meiotischen Reifeteilung exprimiert werden. In der vorliegenden Studie wurde dazu die Literaturliteraturdatenbank PubMed nach geeigneten Markern durchsucht mit dem Ergebnis, dass zur Erfassung dieser Phasen die zwei Proteine OCT2 und SAGE1 ausgewählt werden konnten. Als Referenzmarker für Zellen in der Meiose wurde das Protein SMAD3 genutzt (Hentrich et al., 2011).

Außerdem wurden weitere Marker auch in Ratten- und Mäusehoden von adulten Tieren untersucht. Durch die detaillierte Auswertung konnte gezeigt werden, dass es zwischen den drei Spezies eine weitestgehende Übereinstimmung mit wenigen Differenzen bei der untersuchten Proteinexpression gab. Im Folgenden werden zuerst die Ergebnisse des Speziesvergleichs und anschließend die Auswertung der Patientenanalyse diskutiert.

### 4.1 Lokalisation der untersuchten Proteine in Keimzellen von Ratte, Maus und Mensch

Durch das immunhistochemische Verfahren lassen sich Zellen anhand der Expression der für diese Zellart typischen Proteine identifizieren. Im Umkehrschluss können, bei Kenntnis der zelltypspezifischen Morphologie, durch dieses Verfahren die exprimierten Proteine den distinkten Zellpopulationen zugeordnet werden. Ob die Charakteristika von Markerproteinen jedoch uneingeschränkt für die drei Spezies Ratte, Maus und Mensch gelten, sollte in der vorliegenden Studie überprüft werden. Um möglichst alle Phasen der Keimzellentwicklung zu erfassen, wurden die Marker SPOC1, GILZ, MYBL1, ACE, H2AK5ac und  $\gamma$ H2A.X an bouinfixierten und in Paraffin eingebettete Hodengewebepräparate getestet, deren Expression und Lokalisation im Folgenden diskutiert wird.

#### 4.1.1 SPOC1 in undifferenzierten und differenzierten Spermatogonien

Während das Protein im Maushoden und humanen Hoden in den gleichen Entwicklungsstufen A<sub>s</sub> bis B-Spg vorhanden war, zeigte sich im Rattenhoden keine Lokalisation in den sich differenzierenden Spermatogonientypen In- und B-Spg.

SPOC1 wurde von Bördlein et al. (2011), wie in der vorliegenden Studie, in undifferenzierten Spermatogonien der Maus detektiert, die zudem PLZF koexprimieren. PLZF wurde als Marker für undifferenzierte Spermatogonien Typ A ( $A_s$ - $A_{al}$ ) mit Funktion für die SSC-Selbsterneuerung beschrieben (Buaas et al., 2004; Dadoune, 2007). Durch die Kollokalisation der Marker kann SPOC1 ebenfalls den undifferenzierten Zellen zugeordnet werden. Zusätzlich wurde SPOC1 in der vorliegenden Arbeit im Maushoden auch in späteren, sich differenzierenden Zellen gefunden. Diese Beobachtung machten auch Mohrmann et al. (2005), die SPOC1 in proliferierenden Zellen nahe der Basalmembran nachwiesen. Zudem stellten Kinkley et al. (2009) fest, dass SPOC1 eine Rolle bei der Chromatinorganisation in der Mitose spielt und damit wichtig für die Zellteilung und Proliferation ist. Die Zuordnung des Expressionsmusters von SPOC1 bis zu proliferierenden B-Spg ist damit sowohl aufgrund morphologischer als auch funktioneller Eigenschaften überzeugend.

Für den menschlichen Hoden ließ sich die gleiche Charakteristik der SPOC1-Expression wie im Maushoden feststellen. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Lokalisation in  $A_{dark}$ ,  $A_{pale}$  und B-Spermatogonien stimmt mit den Beschreibungen von Von Kopylow et al. (2012b) überein, die SPOC1 in humanen Spermatogonien mit und ohne Rarefaction Zonen nachwiesen. Eine weitere Arbeit von Von Kopylow et al. (2012a) bestätigte diese Beobachtung, da sie im humanen Hoden SPOC1 mit UTF1, einem Marker für frühe Spermatogonien (Kristensen et al., 2008), koexprimiert fanden.

Das Fehlen der SPOC1-Expression in den weiter differenzierten Spermatogonientypen In- und B-Spg im adulten Rattenhoden konnte in dieser Studie erstmals beobachtet werden und zeigt damit einen geringen Unterschied zur Proteinexpression in Maus- und Menschenkeimzellen auf. Das Ergebnis lässt vermuten, dass die Ratte SPOC1 zwar zur Differenzierung früher Spermatogonien benötigt, im Verlauf der Proliferation aber andere Faktoren für die prämeiotische Chromatinorganisation vorhanden sind. Zur schwachen Färbung von Sertoli-Zellkernen fanden sich in der Literatur keine Hinweise. Auf persönliche Rückfrage wurde diese aber von Prof. H. Will (s. 2.1.3.1) ebenfalls im Mausgewebe beobachtet.

#### **4.1.2 GILZ als prämeiotisches Protein**

Das Protein GILZ konnte in allen drei Spezies detektiert werden, wobei es in den gleichen Entwicklungsstufen im Nagetierhoden und, zeitlich leicht verzögert, in den späteren Stadien des menschlichen Hodens lokalisiert ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen mit den Resultaten von Romero et al. (2012) überein, die eine GILZ-Expression im Zytoplasma von Spermatogonien sowie (prä-)leptotänen Spermatozyten der adulten Maus

beschrieben. Die essentielle Bedeutung, die Romero et al. (2012) dem Molekül GILZ für die frühe Phase der Spermatogenese zuschreiben, wurde von Suarez et al. (2012) bestätigt, da sie in adulten GILZ-Knockoutmäusen signifikant reduzierte Hodenvolumina, Keimzellmängel und eine erhöhte Apoptoserate fanden. Wie auch von Jamsai et al. (2013) für den humanen Hoden beschrieben, konnte GILZ in der vorliegenden Studie in allen drei Spezies in lepto- und zygotänen Spermatozyten intensiv, sowie in deutlich reduzierter Intensität, in frühen pachytänen Spermatozyten nachgewiesen werden. Dieses Expressionsmuster ähnelt dem der langen Isoform des Proteins (L-GILZ). L-GILZ wurde von Bruscoli et al. (2012) in PLZF-positiven undifferenzierten Spermatogonien ( $A_s$ - $A_{al}$ ), PLZF-negativen Spermatogonien ( $A_1$ -B-Spg) sowie lepto- und zygotänen Spermatozyten detektiert. Es ist anzunehmen, dass der in der vorliegenden Arbeit verwendete Marker GILZ auch die lange Isoform des Proteins detektiert und kann damit die Markierung der frühen Meiosestadien erklären.

Anders als im Nagetierhoden ließ sich eine intensive GILZ-Expression in der humanen Spermatogenese erst ab der Entwicklungsstufe der Spermatozyten feststellen, da nur einige Spermatogonien vom Typ  $A_{pale}$  und B zytoplasmatisch markiert waren. Dieses Protein ist beim Menschen im Vergleich zum Nagetierhoden demnach erst in reiferen Entwicklungsstadien exprimiert, was auch Jamsai et al. (2013) beschrieben, die GILZ in runden Spermatiden nachwiesen. Letzteres konnte in der vorliegenden Studie jedoch nicht bestätigt werden, da sich eine deutliche Expression des Proteins GILZ nur in Spermatozyten zeigte. Zusammenfassend lässt sich folgern, dass die spermatogoniale Differenzierung beim Menschen größtenteils GILZ-unabhängig verläuft und die Genexpression des Proteins erst zu einem späteren Zeitpunkt der Entwicklung hochreguliert wird.

#### 4.1.3 MYBL1 und dessen Funktion in der Meiose

Der Transkriptionsfaktor MYBL1 ist ein Mitglied der MYB-Familie, die den Zellzyklus sowie die Differenzierung und Apoptose mitreguliert (Oh & Reddy, 1999). Im Speziellen bezeichneten Bolcun-Filas et al. (2011) den Transkriptionsfaktor als einen Hauptregulator der männlichen Meiose, der an Doppelstrangbruchreparatur, DNA-Synapsis, Crossing Over und Zellzyklusproliferation ab dem pachytänen Stadium beteiligt sein soll. MYBL1 wurde neben Leukozyten vor allem im Hodengewebe nachgewiesen und wurde als proliferationsinduzierender Transkriptionsaktivator beschrieben (Takahashi et al., 1995). Die Studie von Bolcun-Filas et al. (2011) identifizierte MYBL1 im präpubertären Mäusehoden, was dem Zeitpunkt des ersten Auftretens von pachytänen Spermatozyten entspricht und wies eine Expression bis zum diplotänen Entwicklungsstadium nach.

Die Expression von MYBL1 in pachytänen bis diplotänen Spermatozyten konnte in der

vorliegenden Studie in den drei Spezies reproduziert werden und findet sich auch in den Studien von Toscani et al. (1997) und Horvath et al. (2009). Toscani et al. (1997) untersuchten MYBL1-Knockoutmäuse und stellten fest, dass diese einen Arrest der Spermatogenese direkt nach den leptotänen Spermatozyten zeigten. Dadurch wird verdeutlicht, dass MYBL1 für das Fortschreiten der Meiose wichtig ist. Auch Tang & Goldberg (2012) beschrieben, dass MYBL1 ein spezifischer Transkriptionsfaktor zur Genaktivierung in primären Spermatozyten ist. Horvath et al. (2009) wiesen zudem eine andauernde Expression bis in frühe runde Spermatidenkerne nach, was in der vorliegenden Arbeit in ähnlicher Weise beobachtet werden konnte. Hier ließ sich MYBL1 in den akrosomalen Bläschen runder Spermatiden detektieren.

Als Marker pachytäner Spermatozyten war MYBL1 ein interessantes Protein für die Serienuntersuchung von NSP, HYP und SZA. Allerdings war Anti-MYBL1, verglichen mit Anti-SMAD3, weniger gut geeignet pachytäne Meiosestadien zu markieren, da sich ein heterogenes Färbemuster abhängig von der Lage des Tubulus in der Biopsie abzeichnete. So war eine deutliche Markierung der Keimzellen durch MYBL1 nur zentral im Hodenpräparat reproduzierbar, nicht aber in randständigen Tubulusanschnitten, was der Fixierung geschuldet sein könnte. Daher wurde MYBL1 nur für die vergleichende Evaluation der Keimzellen in Hoden von Ratte, Maus und Mensch genutzt und zeigte hier eine Expression in den gleichen Entwicklungsstadien der Spermatogenese.

#### **4.1.4 ACE in der Spermiogenese**

Dieser Marker für späte Spermatogenesestadien ließ sich in den drei untersuchten Spezies in nahezu gleichen Entwicklungsstufen nachweisen. Die Expression von ACE begann in Step 10 elongierenden Spermatiden der Nagetiere sowie in Step 5 Spermatiden des menschlichen Hodens und wurde mit fortschreitendem Entwicklungsstadium intensiver. Außerdem wiesen die Residualkörperchen eine ACE-Markierung auf. Für die Maus wurde das Ergebnis bereits von Langford et al. (1993) beschrieben. Im Vergleich mit Studien von Sibony et al. (1994) und Atanassova et al. (2009) war der Beginn der Expression von ACE in der vorliegenden Arbeit allerdings bei allen drei Spezies auf etwas spätere Entwicklungsstadien der Spermiogenese verschoben. Die beiden genannten Studien beschrieben ACE schon wenige „Steps“ früher in der Spermiogenese der Nagetiere. Atanassova et al. (2009) erklärten die Diskrepanzen zwischen den verschiedenen Studien durch die Verwendung unterschiedlicher Antikörper.

Für die in der vorliegenden Arbeit detektierte ACE-Lokalisation im humanen Hoden (ab Step 5 Spermatiden) konnte im Literaturvergleich ebenfalls eine geringe Differenz fest-

gestellt werden. Pauls et al. (2003) beschrieben eine schwache ACE-Expression im humanen Gewebe bereits in der dünnen adluminalen Membranseite von Step 3 elongierenden Spermatiden. Starke Signale fanden sie jedoch erst ab den elongierenden Spermatiden sowie in den Residualkörperchen, was den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit entspricht. Pauls et al. (2003) wiesen wie Atanassova et al. (2009) darauf hin, dass sich Differenzen in der Proteinlokalisierung dadurch erklären lassen, dass der von ihnen verwendete monoklonale Antikörper, im Gegensatz zu den polyklonalen Antisera früherer Studien, keine Proteinvorläufer detektiert. Da in dieser Studie ebenfalls ein monoklonaler Antikörper verwendet wurde, der das aktive Protein ACE im Hoden markiert, kann die hier beschriebene zeitverzögerte Detektion erklärt werden. Das Ergebnis einer ACE-Expression in gleichen Spermatogenesestadien von Ratte, Maus und Mensch konnte somit gezeigt werden.

#### **4.1.5 Acetylierung von Kernhistonen**

Die Acetylierung von Histonen ist für die Chromatinanordnung wichtig (Grunstein, 1997) und induziert eine Lockerung der DNA-Histon-Bindung, wodurch in der frühen Spermatogenese die Transkription aktiviert wird (Kuo & Allis, 1998). Dies findet in der Keimzellentwicklung wiederkehrend statt. Die Histone werden im Verlauf durch Protamine ersetzt, wobei der Histon-Protamin-Austausch in den kondensierenden Spermatiden durch die Reacetylierung von elongierenden Spermatiden in der späten Spermatogenese beeinflusst wird (Hazzouri et al., 2000).

In der Vergangenheit konnten Studien für die hier untersuchten Spezies eine Acetylierung von Kernhistonen (H2A, H2B, H3, H4) vor ihrem Ersetzen durch Protamine nachweisen. Grimes & Henderson (1984) sowie Meistrich et al. (1992) zeigten eine Hyperacetylierung von Histon H4 in elongierten Spermatiden der Ratte. Hazzouri et al. (2000) wiesen eine Hyperacetylierung von Histon H2A in Spermatogonien, (prä-)leptotänen Spermatozyten sowie elongierten Spermatiden (Step 9-11) im Maushoden und im humanen Hoden nach. Diese Lokalisationen konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Allerdings konnte, im Unterschied zu Hazzouri et al. (2000), die beginnende Acetylierung in der Maus schon in den runden Spermatiden (Step 7) beobachtet werden. Die durch Anti-H2AK5ac detektierte Acetylierung im menschlichen Hoden ist vergleichbar mit der Modifikation des Kernhistons H4, die Sonnack et al. (2002) in Spermatogonien, (prä-)leptotänen Spermatozyten und Step 3-5 Spermatiden beschrieben. Dadurch wird deutlich, dass die Kernhistone in ähnlichen Keimzelldifferenzierungsstadien in der Spermatogenese acetyliert werden.

Für den menschlichen Hoden zeigten Faure et al. (2003), dass zusätzlich zu Keimzellen

auch Sertoli-Zellkerne eine Acetylierung von H4 aufweisen. In der vorliegenden Arbeit konnte diese Modifikation entsprechend für das Histon H2A beschrieben werden. Die Markierung der Sertoli-Zellkerne durch Anti-H2AK5ac war jedoch störend bei der Quantifizierung früher Spermatogenesestadien im humanen Hoden. Aus diesem Grund wurde der Antikörper nicht für eine Serienauswertung mit NSP, HYP und SZA verwendet. Die Evaluation des Markers diene aber dazu, den dynamischen Prozess der Acetylierung, der für die Transkription und den Histamin-Protamin-Austausch wichtig ist (s.o.), darzustellen. Diese Modifikation tritt bei Ratte, Maus und Mensch in fast gleichen Entwicklungsstadien auf.

#### **4.1.6 $\gamma$ H2A.X als Indikator von Doppelstrangbrüchen und XY-Inaktivierung**

Die Meiose spielt eine zentrale Rolle bei der sexuellen Reproduktion. Durch die Kombination von zwei elterlichen Keimzellen wird die DNA eines neuen Individuums geschaffen (Inagaki et al., 2010). Während der Meiose kommt es durch Paarung und Crossover homologer Chromosomen zur Rekombination, die durch programmierte Doppelstrangbrüche (DSB) initiiert wird (Keeney et al., 1997; Bolcun-Filas et al., 2011). Die Paarung der Chromosomen beginnt im Leptotän, besteht im Zygotän fort und ist im Pachytän vollendet (Inagaki et al., 2010). Das Histon H2A.X nimmt bei diesem Prozess eine wichtige Stellung ein. Als zelluläre Antwort auf DSBs wird H2A.X an Serin 139 phosphoryliert und dann als  $\gamma$ H2A.X bezeichnet (Mahadevaiah et al., 2001). Dies führt zur Akkumulation von DNA-Reparaturproteinen (Rogakou et al., 1998; Paull et al., 2000). Eine Dephosphorylierung von  $\gamma$ H2A.X geht mit fortschreitender homologer Paarung einher, die in normalen Spermatozyten zum Zeitpunkt des Zygotän-Pachytän-Übergangs fertiggestellt ist (Mahadevaiah et al., 2001; Blanco-Rodríguez, 2012). Ab dem Pachytän wird H2A.X nur noch in den kondensierten Sex-Vesikeln pachytäner Spermatozyten phosphoryliert, die durch die „Meiotic sex chromosome inactivation“ (MSCI) transkriptional inaktiviert sind (Fernandez-Capetillo et al., 2003; Handel, 2004). Die Initiation der MSCI ist in Mäusen und Menschen ähnlich (De Vries et al., 2012) und es wird spekuliert, dass dies ein evolutionärer Mechanismus zum transkriptionellen „Gen-Silencing“ sein könnte (Inagaki et al., 2010; Royo et al., 2010). Bei Versagen der MSCI gehen nach Annahmen von Turner (2007) Spermatozyten zum Schutz vor fehlerhafter Transkription während des Pachytäns in den Zelltod. Des Weiteren wurde beschrieben, dass  $\gamma$ H2A.X auch in Spermatogonien exprimiert ist und die Menge an Phosphorylierung mit dem Grad der spermatogonialen Differenzierung bzw. chromosomalen Kondensation korreliert (Blanco-Rodríguez, 2009).

Zum Verständnis des Expressionsmusters von  $\gamma$ H2A.X im Spermatogeneseprozess sind



diese vielseitigen Funktionen des phosphorylierten Histons von Bedeutung. Die in der vorliegenden Studie für den Speziesvergleich ermittelte Lokalisation von  $\gamma$ H2A.X stimmt mit den Ergebnissen vorhergehender Studien nahezu überein. H2A.X ist im Maus- und Rattenhoden in (prä-)leptotenen (Stadium VIII) bis zygotänen Spermatozyten, sowie in Sex-Vesikeln pachytäner Spermatozyten bis Stadium XII der Ratte (X bei der Maus) phosphoryliert (Mahadevaiah et al., 2001; Hamer et al., 2003). Cabrero et al. (2007) konnten, in Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit,  $\gamma$ H2A.X auch in einigen elongierten Spermatiden bei Grashüpfern nachweisen. Eine Expression in B-Spg der Maus fanden auch Hamer et al. (2003). Anders als Hamer et al. (2003) und Blanco-Rodríguez (2009) konnte  $\gamma$ H2A.X im Nagetierhoden in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht in runden Spermatiden nachgewiesen werden. Außerdem analysierte Blanco-Rodríguez (2009) die zyklische De- und Rephosphorylierung innerhalb eines Stadiums (z.B. Phosphorylierung im frühen (Prä-)Leptotän, Dephosphorylierung im späten (Prä-)Lpreptotän, Rephosphorylierung im Leptotän) sehr detailliert. Darauf wurde in der vorliegenden Studie verzichtet, da dies für den Speziesvergleich keine Relevanz hatte.

Im menschlichen Hoden konnte eine mit der Literatur übereinstimmende Expression von  $\gamma$ H2A.X ab den frühen leptotänen Spermatozyten bis zum Sex-Vesikel in pachytänen Spermatozyten beschrieben werden (Brown et al., 2005; De Vries et al., 2012), wobei das Signal im Zygotän bei schon erfolgter Synapsis reduziert war (Roig et al., 2004). Die Rephosphorylierung in Step 3-4 Spermatiden wird in der vorliegenden Arbeit für den Menschen erstmalig beschrieben.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das Expressionsmuster von phosphoryliertem Histon H2A.X in den drei Spezies ähnlich ist, sich aber zwischen den Nagetieren und auch im Vergleich mit dem Menschen geringe Differenzen darstellten. Dies galt im Speziellen neben der zeitliche Expression auch für die Expressionsintensität, die beim Menschen deutlich geringer war. Auch De Vries et al. (2012) beschrieben eine geringer ausgeprägte MSCI beim Menschen verglichen mit der Maus, die sie auf genetische Veränderungen der XY-Chromosomen während der Evolution zurückführten und die zur humanen Spermaheterogenität beitragen könnte.

Außerdem konnte bei der Evaluation von zwei verschiedenen  $\gamma$ H2A.X-Antikörpern festgestellt werden, dass es Marker gibt, die das entsprechende Protein in allen Spezies sicher detektieren und solche, die bei einer Spezies durch unspezifische Bindungen Strukturen darstellen, die das gesuchte Protein nicht exprimieren. Um eine zuverlässige Detektion von bestimmten Proteinen zu gewährleisten, empfiehlt es sich daher, einen Marker an verschiedenen Spezies zu testen.

## 4.2 Proteinexpression im Speziesvergleich

Zur Erörterung der Übertragbarkeit von Spermatogenesemarkern wurden vergleichend Studien herangezogen, die sich mit Keimzellexpressionsmustern in verschiedenen Spezies beschäftigten.

Dym et al. (2009) stellten beim Vergleich von spermatogonialen Markern im Nagetier- und menschlichen Hoden fest, dass die speziesentsprechenden Entwicklungsstufen sowohl gleiche als auch unterschiedliche, phänotypische Expressionsmuster aufweisen. Dies lässt vermuten, dass einige Proteine der Keimzellentwicklung evolutionär konserviert und andere Proteine nur im Nagetierhoden oder nur im Menschenhoden detektierbar sind. Entsprechendes nahmen auch Kolasa et al. (2012) an, da sie sieben von 19 untersuchten Markern sowohl in menschlichen als auch in Nagetier-Spermatogonien nachwiesen. Weiter beschrieben Dym et al. (2009), dass manche Proteine im menschlichen Hoden, verglichen mit dem Nagetierhoden, zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Spermatogenese exprimiert werden. So fanden beispielsweise Kido & Lau (2006) das Protein TSPY im humanen Gewebe in Spermatogonien und konträr dazu im Rattenhoden in elongierten Spermatiden. Es wurde postuliert, dass die verschiedenen Expressionsmuster mit einer variierenden Funktion für die Spermatogenese zusammenhängen. Eine weitere Studie befasste sich mit dem Vergleich von spermatogonialen Mustern in Mäusen und Rhesus-Affen (Hermann et al., 2010). Sie beschrieben ein beachtliches Ausmaß an evolutionär konservierten Expressionsmustern in den Spermatogonien der Spezies. Sie stellten aber auch fest, dass einige der untersuchten spermatogonialen Proteine im Affenhoden, verglichen mit dem Maushoden, teilweise verlängert oder in späteren Entwicklungsstadien exprimiert werden. Da Affen wie Menschen zur Gruppe der Primaten gehören und auch Mitchell et al. (2008) eine vergleichbare Keimzelldifferenzierung und –proliferation im fetalen und frühen postnatalen Lebensalter von Seidenaffen und Menschen fanden, ist dies ein weiterer Hinweis auf das Vorhandensein unterschiedlicher Vorgänge in der Keimzellreifung zwischen Nagetieren und dem Menschen. Des Weiteren beschrieben Encinas et al. (2012), dass sich die primordiale Keimzellentwicklung sogar zwischen Ratten und Mäusen zum Teil unterscheidet. Sie wiesen darauf hin, dass Ratten, die bisher seltener als Mäuse zur Erforschung der Spermatogenese verwendet werden, aufgrund einiger differierender Keimzellprozesse ebenfalls als Forschungsobjekt von Nutzen sein könnten.

Die Ergebnisse der o.g. Studien konzentrierten sich auf die frühen Stadien der Spermatogenese. Ein Aspekt der vorliegenden Arbeit war es, zu analysieren, ob sich spezifische Proteinstrukturen in ihrer Expression im gesamten zeitlichen Verlauf der Spermatogenese im Speziesvergleich unterscheiden. Die Arbeit stellt damit eine Erweiterung der

vorherigen Studien dar.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Studien von Dym et al. (2009), Hermann et al. (2010) und Encinas et al. (2012) wurden in der vorliegenden Studie einerseits Proteine identifiziert, die in gleichen Entwicklungsstadien in den drei Spezies exprimiert waren (ACE, MYBL1). Weiter konnte bestätigt werden, dass einige Proteine speziesabhängig zu früheren oder späteren Zeitpunkten der Spermatogenese exprimiert werden (SPOC1, GILZ, H2AK5ac,  $\gamma$ H2A.X).

Anders als Zhao et al. (2004), die zwischen Ratten- und Menschengenom mehr Ähnlichkeiten als zwischen Maus- und Menschengenom beschrieben, zeigte sich in der vorliegende Studie keine dementsprechende Regelmäßigkeit bei der Analyse der Expressionsmuster. Diese Diskrepanz könnte darin begründet liegen, dass sich die Aussage von Zhao et al. (2004) auf die genetische Ebene bezieht, während in dieser Arbeit die Proteinebene erfasst wird. Damit wird deutlich, dass auch posttranslationale Vorgänge zur Evaluation von Speziesunterschieden relevant sind.

Es lässt sich resümieren, dass die Expressionsmuster der untersuchten Proteinmarker bei Ratte, Maus und Mensch weitestgehend übereinstimmen. Es ließ sich jedoch besonders bei der Spermatogonienentwicklung eine gewisse Heterogenität zwischen den Spezies feststellen. Bei der Identifikation von Zellen mittels Proteinmarkern, beispielsweise bei in vitro-Zellkulturstudien, sollte demnach überprüft werden, ob die ausgewählten Marker die gesuchten Zellen auch in der entsprechenden Spezies detektieren. Andernfalls kann es, wie in dieser Studie für  $\gamma$ H2A.X gezeigt, zur Isolierung von unerwünschten Zellen bzw. Darstellung anderer Strukturen durch unspezifische Bindungen kommen.

### **4.3 Serienuntersuchung mit OCT2, SAGE1 und SMAD3**

Im Folgenden werden zunächst die immunhistochemischen Expressionsmuster der ausgewählten Proteine erläutert, mit denen eine Serienuntersuchung an 90 Patienten der Klassifikationen NSP, HYP und SZA durchgeführt wurde. Anschließend werden die Ergebnisse der Quantifikation und die neu erstellten Gruppierungen zur Beschreibung der frühen Spermatogeneseprozesse interpretiert.

#### **4.3.1 OCT2 als Marker für undifferenzierte Spermatogonien**

Eine Subgruppe der  $A_{\text{dark}}$  und der  $A_{\text{pale}}$  Spermatogonien, die undifferenzierte Spermatogonien enthalten, wurde in der vorliegenden Arbeit im humanen Hodengewebe als OCT2-positiv identifiziert. Übereinstimmend machte ein Schema in der Arbeit von Looijenga (2011) deutlich, dass nicht alle  $A_{\text{dark}}$ , sondern nur eine Untergruppe OCT2-

positiv ist. Looijenga (2011) definierte des Weiteren Präspmatogonien im präpubertären Hodengewebe als OCT2-positiv, differenzierte diese jedoch wie Lim et al. (2011) klar von OCT4-positiven Gonozyten, die OCT2-negativ sind. OCT4 ist als intrinsischer Regulator pluripotenter Stammzellen beschrieben, der auch einen entscheidenden Einfluss auf die Proliferation und den Erhalt von Spermatogonien haben soll (De Rooij & Griswold, 2012). Hierbei wird deutlich, dass die Familie der OCT für die Entstehung früher Spermatogonien wichtig ist.

Anders als in der vorliegenden Studie fanden Lim et al. (2011) eine OCT2-Expression ausschließlich in  $A_{\text{dark}}$  Spermatogonien. Die Tatsache, dass in dieser Arbeit auch OCT2-positiv  $A_{\text{pale}}$  Spermatogonien identifiziert wurden, kann darin begründet sein, dass das größere Kollektiv von 90 untersuchten Patientenproben gegenüber der Kontrollgruppe von drei Patienten in der Studie von Lim et al. (2011) besser geeignet war, alle OCT2-positiven Zelltypen zu identifizieren. Zusätzlich sollte berücksichtigt werden, dass die vielfach diskutierte Einteilung humaner Spermatogonien in  $A_{\text{dark}}$  und  $A_{\text{pale}}$  angesichts der uneinheitlichen Phänotypen möglicherweise noch zu wenig differenziert ist. Auch Hermann et al. (2010) fanden beispielsweise in dem Menschen nah verwandten Rhesus-Affen Typ  $A_{\text{pale}}$  Spermatogonien, die einen undifferenzierten Phänotyp aufwiesen und gleichzeitig  $A_{\text{pale}}$ , die phänotypisch eher den Progenitorspermatogonien entsprachen. Zusammenfassend liefert die vorliegende Studie einen weiteren Hinweis dafür, dass es, wie bereits von Ehmcke et al. (2006) und Dym et al. (2009) postuliert, auch bei humanen Spermatogonien verschiedene „Typen“ der  $A_{\text{pale}}$  und auch der  $A_{\text{dark}}$  gibt, die unterschiedlich entwickelte Stufen im Spermatogeneseprozess repräsentieren.

#### **4.3.2 SAGE1 in mitotischen, differenzierenden Spermatogonien und frühen Spermatozyten**

Die prämeiotischen Vorgänge der Spermatogenese beinhalten Zellteilung und –differenzierung und lassen die Zellen anschließend in die Meiose eintreten. Die Proteinexpression von SAGE1 fällt in diese Phase und konnte in der vorliegenden Arbeit in  $A_{\text{pale}}$  bis zu (prä-)leptotänen Spermatozyten sowie in mitotischen Spermatogonien nachgewiesen werden. Zudem exprimierten sehr wenige  $A_{\text{dark}}$  Spermatogonien SAGE1. Diese Lokalisation in der frühen Spermatogenese stimmt mit publizierten Ergebnissen überein. Lim et al. (2011) fanden SAGE1 im humanen Hoden in einer Untergruppe von Spermatogonien Typ A und in weiter differenzierten Spermatogonien, die sie anhand des größeren und runderen Nukleus identifizierten. Weiter wiesen sie keine SAGE1-Expression während der präpubertären Entwicklung nach, was die Vermutung stützt, dass dieses Pro-

tein nach der Pubertät hochreguliert wird. Die Lokalisation von SAGE1 in einer Untergruppe von A<sub>dark</sub> und (prä-)leptotänen Spermatozyten wird ebenso von Looijenga (2011) dargestellt. Chen et al. (2011) wiesen darauf hin, dass SAGE1 nur in frühen primären Spermatozyten exprimiert wird, nicht aber in postmeiotischen Keimzellen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Lokalisation von SAGE1 aber erstmalig in wenigen runden Spermatiden beschrieben.

Diese Resultate zeigen, dass sich das Protein SAGE1 dazu eignet, Keimzellen in der Phase der frühen Spermatogenese mit sich teilenden und differenzierenden Spermatogonien sowie den Übergang zur Meiose zu erfassen.

#### **4.3.3 SMAD3 in pachytänen Spermatozyten**

Das Protein SMAD3 gehört zur Gruppe der SMAD-Signalproteine, die die Signaltransduktion der Zytokin-Superfamilie TGF $\beta$  (transforming growth factor beta type) modulieren (Feng und Derynck, 1997). TGF $\beta$  wird u.a. im Hoden exprimiert und soll eine wichtige Rolle bei der Hodenentwicklung und Spermatogenese spielen (Xu et al., 2003). Die SMAD-Proteine übertragen als intrazelluläre Effektoren TGF $\beta$ -Signale von der Zelloberfläche in den Zellkern, was Einfluss auf die Transkription hat (Derynck & Zhang, 2003). Itman et al. (2011) identifizierten SMAD3 weiterhin als Schlüsselmediator von aktivinin-induzierter Sertoli-Zellproliferation und vermuteten, dass der Übergang von proliferierenden zu postmitotischen Keimzellen und schließlich zum differenzierten Stadium mit der Herunterregulierung von SMAD3 vermittelter Signalübertragung assoziiert ist.

Die in dieser Studie beobachtete Expression von SMAD3 in pachytänen Spermatozyten des humanen Hodens stimmte mit Ergebnissen vorangegangener Studien überein. Im Rattenhoden wiesen Xu et al. (2003) eine zytoplasmatische Lokalisation von SMAD3 in pachytänen Spermatozyten nach, was Itman et al. (2011) ebenfalls für den Maushoden fanden. Weiterhin ließen sich die SMAD3-positiven Spermatogonien und wenigen runden Spermatiden mit Resultaten dieser beiden Studien abgleichen. Die Expression von SMAD3 in Sertoli-Zellen wurde in vergangenen Arbeiten uneinheitlich zytoplasmatisch (Xu et al., 2003; Itman et al., 2011) sowie im Rattenhoden auch nukleär beschrieben (Xu et al., 2003). In der vorliegenden Studie wurde die Markierung der Sertoli-Zellkerne als blass mit deutlichem perinukleären Saum definiert.

Der Marker war durch die deutliche Kennzeichnung von meiotischen Keimzellen gut dazu geeignet, die Zahl der SMAD3-positiven pachytänen Spermatozyten in den Patientenklassifikationen NSP, HYP und SZA zu evaluieren. Er konnte damit als Referenzwert für die Ausprägung des gerade stattfindenden Meioseprozesses bzw. der frühen Meiose für jeden einzelnen Tubulus herangezogen werden.

#### 4.3.4 Interpretation der Quantifikation

In der Vergangenheit wurden verschiedene Ansätze entwickelt, um Zellen in humanen Hodenbiopsien zu quantifizieren. Rowley & Heller (1971) beschrieben die Anzahl der Sertoli-Zellen als Konstante in Tubuliquerschnitten von Hodenbiopsien. Ausgehend von dieser Annahme lässt sich die Sertoli-Zellratio für Keimzellen bestimmen, die aussagt, wie viele Keimzellen eines bestimmten Entwicklungsstadiums pro Sertoli-Zelle vorhanden sind. Dieses Modell benutzten auch Skakkebaek et al. (1973) für Studien mit fertilen Männern und 46,XY-Männern. Dagegen bestimmten Matsuda et al. (1996) in ihrer Arbeit die Anzahl der Keimzellen pro Tubulusquerschnitt.

In der vorliegenden Studie wurde das letztere Verfahren zur Quantifizierung der Keimzellzahlen in Hodenbiopsien der Patienten gewählt, da die Untersuchungen von Hentrich et al. (2011) zeigten, dass die Anzahl von Sertoli-Zellen bei Patienten mit Spermatozytenarrest gegenüber NSP- und HYP-Patienten signifikant verringert ist. Daher würde bei einer gleichzeitigen Reduktion der Sertoli-Zellen und der Keimzellen in den Tubulusquerschnitten von z.B. SZA-Patienten eine ähnliche Sertoli-Zellratio wie bei NSP-Patienten resultieren. Aus diesem Grund ist die Sertoli-Zellratio kein geeignetes Maß zur Detektion etwaiger Unterschiede zwischen den Patienten, weshalb die Keimzellzahlen pro Tubulusquerschnitt ermittelt wurden.

Die Auswertung der OCT2-positiven Zellen, bei denen es sich größtenteils um eine Subpopulation von Spermatogonien Typ A<sub>dark</sub> handelt, ergab für die NSP- und HYP-Patienten im Mittel eine fast identische Anzahl für diese undifferenzierten Spermatogonien mit Stammzellcharakter. Ohne A<sub>dark</sub>, die zur Keimzellselbsterneuerung beitragen sollen, gibt es laut Holstein (1999) kein Vollbild spermatogenetischer Aktivität. SZA-Patienten zeigten gegenüber den NSP- und HYP-Patienten jeweils eine signifikante Reduktion der OCT2-positiven Zellen. Dieses Ergebnis bestätigt die Resultate von Hentrich et al. (2011), die bei der Quantifizierung einer Subpopulation von undifferenzierten Spermatogonien, den UTF1-positiven Keimzellen, keine signifikanten Unterschiede zwischen NSP- und HYP-Patienten, aber eine Reduktion bei SZA-Patienten fanden. Somit lässt die Verminderung des OCT2-markierten Pools undifferenzierter Spermatogonien bei SZA-Patienten auf eine eingeschränkte Fähigkeit zur Selbsterneuerung mit resultierender Spermatogenesestörung schließen.

Die Analyse der Mittelwerte von SAGE1-positiven Zellen im Hoden demonstrierte, dass Patienten mit reduzierter bzw. unvollständiger Spermatogenesefunktion (HYP und SZA) im Vergleich zu NSP-Patienten insgesamt signifikant verringerte Zellzahlen von Sper-

matogonien in Mitose und Differenzierung haben. Zu einem vergleichbaren Resultat kamen auch Bar-Shira Maymon et al. (2003), die eine signifikante Reduktion von PCNA-positiven Zellen bei Patienten mit Spermatogenesedefekten beschrieben. PCNA ist ein Protein, welches in proliferierenden Zellen exprimiert ist. Sie folgerten deshalb, dass die Reduktion der PCNA-positiven Zellen auf das Vorhandensein von mitotisch inaktiven Spermatogonien hindeutet. Auch Steger et al. (1998) beschrieben eine ähnliche Reduktion für HYP- und SZA-Patienten. Die herabgesetzte mitotische Aktivität und Differenzierung von Spermatogonien könnte neben meiotischen und postmeiotischen Defekten folglich ein weiterer Grund für eine eingeschränkte Spermatogenese bei HYP und SZA sein. HYP und SZA hatten, verglichen mit NSP, eine ähnlich ausgeprägte Reduktion SAGE1-positiver Zellen.

Zur Reduktion SMAD3-positiver pachytäner Spermatozyten bei HYP- und SZA-Patienten in der vorliegenden Studie ließen sich gleichartige Ergebnisse in früheren Studien finden. Bereits Roosen-Runge et al. (1957) und Zukerman et al. (1978) beschrieben ohne markergestützte Analyse teilweise reduzierte Spermatozytenzahlen bei infertilen Patienten bzw. bei Patienten mit verminderter Spermienzahl. Auch Hentrich et al. (2011) stellten bei Patienten mit Spermatogenesedefiziten neben der Reduktion von Sertoli-Zellen und Spermatogonien verminderte Spermatozytenzahlen fest.

Gegensätzlich hierzu fanden Silber et al. (1997) bei SZA-Patienten, verglichen mit NSP-Patienten, eine ähnliche Anzahl pachytäner Spermatozyten. Diese Diskrepanz lässt sich damit erklären, dass die bei Silber et al. (1997) verwendete Hämatoxylin-Eosin-Färbung alle Zellen im Hoden unabhängig von einer stadienspezifischen Expression bestimmter Proteine markiert. So wird bei diesem Verfahren nicht berücksichtigt, dass das Fehlen einer Expression auf dysfunktionale meiotische Zellen oder einen Defekt in der frühen Spermatogenese hinweisen kann. Zudem fiel in der vorliegenden Studie auf, dass bei SZA-Patienten häufig ungewöhnlich große, SMAD3-negative Spermatozyten zu finden waren, bei denen es sich um „Megalospermatozyten“ handeln könnte, die eine Asynapsis der homologen Chromosomen aufweisen und anschließend apoptotisch werden (Holstein et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit wurden daher nur deutlich SMAD3-positiv Zellen quantifiziert und SMAD3-negative Spermatozyten als strukturell geschädigt betrachtet. SMAD3 wurde bereits von Hentrich et al. (2011) zur Quantifizierung genutzt und diente in dieser Studie zur Beurteilung der Meiose-Effizienz im Zusammenhang mit einer detaillierten Analyse der vorangehenden Entwicklungsstadien.

#### 4.3.5 Analyse der Spermatogenesedefizite

Es ist bekannt, dass sich eine Dysfunktion in der Meiose auf den Ausgang der Keimzellentwicklung auswirkt und damit zu Infertilität führen kann (Ferguson et al., 2007). Vielfach ist für das Krankheitsbild „Spermatozytenarrest“ beispielsweise ätiologisch eine Störung bei der Chromosomenpaarung (Synapsis) und der Rekombination (Gonsalves et al., 2004) sowie eine Häufung von genetischen Abnormitäten zu finden (Weedin et al., 2011).

Es gibt jedoch nur wenige Studien, die sich explizit mit den prämeiotischen Zuständen im Zusammenhang mit der Spermatogeneseeffizienz befassen. Steger et al. (1998) stellten fest, dass die Effizienz des Spermatogeneseprozesses von der mitotischen Aktivität der Spermatogonien und der Keimzellverluste während der Meiose und der Spermiogenese abhängt. Ähnlich publizierten schon Johnson et al. (1983), dass während der Postprophase der Meiose ein Verlust der potenziellen Spermaproduktion um bis zu 50% auftreten kann. Für spätere Stadien beschrieben Weedin et al. (2011), dass Männer mit einem Arrest auf der Stufe der sekundären Spermatozyten (früher Arrest) weniger wahrscheinlich Spermatozoen aufweisen als Männer mit einem späten Arrest (Arrest auf der Stufe von Spermatiden).

Um in der vorliegenden Arbeit Patienten mit verminderter oder arretierter Spermatogenese auf in Hinblick auf frühe Spermatogenesedefizite zu untersuchen, wurden die Hodenbiopsien der Patienten individuell analysiert und Gruppierungen vorgenommen. Als Referenzwert wurde die Meiose-Effizienz (SMAD3-positive Spermatozyten) betrachtet, die eine Momentaufnahme des aktuellen frühen Meioseprozesses (Anzahl pachytäner Spermatozyten), unabhängig von der Klassifikation nach Bergmann & Kliesch (1998, 2009), erfasst. Im Folgenden werden die Resultate der Analyse sowie mögliche Ursachen für die vorliegenden Defizite erläutert.

##### 4.3.5.1 Prämeiotische Defizite

Nach Johnson et al. (1987) ist die Anzahl später primärer Spermatozyten von der Zahl der spermatogonialen Stammzellen, der Proliferationsrate und der Menge an degenerierten Spermatogonien und frühen Spermatozyten abhängig. Aus diesem Grund wurden die frühen Spermatogonien (Phase 1) und die Spermatogonien in Mitose, Differenzierung und die (prä-)leptotäne Spermatozyten (Phase 2) in der vorliegenden Studie im Zusammenhang mit der Meiose-Effizienz evaluiert. Es stellte sich heraus, dass prämeiotische Defizite bei allen untersuchten Gruppen vorkommen, diese bei den NSP-Patienten aber nie und bei den SZA-Patienten am häufigsten mit einer geringen Meiose-Effizienz einhergehen. Insgesamt zeichnete sich ab, dass bei den SZA-Patienten sieben



Mal häufiger Defizite in der unmittelbaren Prämeiose (Phase 2) als rein reduzierte Zahlen früher Spermatogonien (Phase 1) und eine geringe Meiose-Effizienz vorliegen. Daraus lässt sich folgern, dass die Phase der Mitose und Differenzierung von Spermatogonien am Übergang in die Meiose in besonderem Maße mitentscheidend für die gesamte Spermatogenese ist.

#### **4.3.5.2 Ineffiziente Spermatogenese wegen dysfunktionaler Sertoli-Zellen**

Als Begründung für eine stattfindende Zelldegeneration während der Keimzellentwicklung beschrieb bereits Oakberg (1956) im Mausmodell einen möglicherweise vorliegenden Selektionsmechanismus zur Elimination von Chromosomenanomalien. Für Hypospermatogenesepatienten stellten Takagi et al. (2001) fest, dass ein Ungleichgewicht zwischen Zellproliferation und Apoptose von Spermatogonien mitursächlich für eine pathologische Spermatogenese sein könnte.

Huckins (1978) beschrieb als erster, dass es sich bei der Zelldegeneration im Nagetierhoden auch um einen Mechanismus handeln könnte, der die Keimzellpopulation an die Anzahl und die Fähigkeiten der Sertoli-Zellen anpasst. Da bei Patienten mit beeinträchtigter Spermatogenese ebenfalls reduzierte Sertoli-Zellzahlen vorliegen (Hentrich et al., 2011) und Patienten mit stark eingeschränkter Spermatogenese neben murenen Sertoli-Zellen auch immature Sertoli-Zellen aufweisen (Steger et al., 1999; Bar-Shira Maymon et al., 2003) kann angenommen werden, dass dieser Mechanismus auch beim Menschen vorhanden ist. Die dysfunktionalen Sertoli-Zellen können daher als eine der Ursachen für eine ineffiziente Spermatogenese betrachtet werden.

#### **4.3.5.3 Kompensationsmechanismen von Defiziten bei NSP und HYP**

Holstein (1999) beschrieb eine reduzierte Anzahl von  $A_{\text{dark}}$  oder eine eingeschränkte Proliferation von Spermatogonien als kompensierte Defekte, wenn trotz diesen Defiziten noch ausreichend Spermatozoen vorhanden sind. Im Gegensatz dazu liegen laut Holstein nicht kompensierte Defekte vor, wenn die Spermatogenese in der Meiose zum Stillstand kommt. Er bestimmte die Spermatogeneseeffizienz anhand vorhandener Spermatozoen, was vergleichbar mit der Einteilung nach Bergmann & Kliesch (1998, 2009) ist. Da in der vorliegenden Studie jedoch beabsichtigt wurde, explizit die frühe Phase der Spermatogenese zu analysieren, erfolgte die Bestimmung der Effizienz mittels der SMAD3-positiven, pachytänen Spermatozoen. In diesem Verfahren haben postmeiotischen Defizite keinen Einfluss auf die Ergebnisse.

Durch die Gruppierungen des neuen, markergestützten Klassifikationssystems wurde

deutlich, dass die HYP-Patienten am heterogensten verteilt waren. Auch Takagi et al. (2001) stellten bereits fest, dass sich sehr unterschiedliche Gründe für Hypospermato-genese finden lassen. In der vorliegenden Studie gab es HYP-Patienten mit hoher und geringer Meiose-Effizienz in fast allen Kombinationen mit oder ohne reduzierte frühe Spermatogonien bzw. differenzierende Spermatogonien und frühen Spermatozyten. Verglichen mit den SZA-Patienten lag jedoch wesentlich seltener eine geringe Meiose-Effizienz vor. Vor allem in den Untergruppen 2-4 mit hoher Meiose-Effizienz und reduzierten Zellzahlen der frühen Spermatogenese, die auch NSP-Patienten beinhalten, lassen sich Kompensationsmechanismen postulieren, die frühe Defizite durch eine hocheffiziente Meiose korrigieren können. Den SZA-Patienten fehlen die vermeintlichen Kompensationsmechanismen, so dass es, wie dies auch Holstein (1999) beschrieb, aufgrund der nicht kompensierten Defekte zum Spermatogenese-arrest kommt.

#### **4.3.6 Nutzen des neuen Klassifikationssystems**

Die vorliegende Studie erweitert das Klassifikationssystem von Bergmann & Kliesch (1998) und bestätigt die Einteilung von Hentrich et al. (2011) in stammzellpoolabhängige und meiotische Defizite. In der Arbeit werden insbesondere Aspekte zur frühen Spermatogenese ergänzt, da in dieser Phase der Keimzellentwicklung bereits Ursachen von Spermatogenesedefiziten zu finden sind, die zu Infertilität führen können.

Das individuelle Klassifikationssystem basiert auf der Markierung von Proteinexpressionsmustern, die spezifische Keimzellen detektieren. Auf diese Weise können die Keimzellen in bestimmten Stadien, im vorliegenden Fall in der frühen Spermatogenese, quantifiziert werden. Dabei wurde aufgezeigt, dass bei Patienten mit Spermatogenesedefiziten neben reduzierten Zahlen an Spermatozyten auch reduzierte Spermatogonienzahlen vorliegen. Bei diesen Patienten ließen sich besonders häufig prämeiotische Defizite feststellen. Folglich ist anzunehmen, dass hier, anders als bei NSP- und einigen HYP-Patienten, keine ausreichenden Kompensationsmechanismen, beispielsweise durch eine hohe Meiose-Effizienz, vorhanden sind (Borgers et al., 2014). Anders als in der Klassifikation von Bergmann & Kliesch (1998, 2009) wird nicht nur histomorphologisch anhand der elongierten Spermatozoen klassifiziert, sondern die Dynamik der Phasen im Zusammenhang betrachtet und dadurch eine differenziertere Diagnostik einzelner Keimzellentwicklungsphasen ermöglicht. Nachfolgende Studien sollten darauf abzielen, die spermatogonialen Stamm- und Keimzellen hinsichtlich der funktionellen Proteinexpression zu untersuchen, um zukünftig möglicherweise individuelle Therapieansätze entsprechend der Spermatogenesedefizite zu entwickeln.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden aus der Datenbank PubMed immunhistochemische Marker identifiziert, mit deren Hilfe verschiedene Proteinexpressionsmuster während der Keimzellentwicklung der Spezies Mensch, Ratte und Maus verglichen werden konnten. Anti-SPOC1 wurde für Spermatogonien, Anti-GILZ für Spermatogonien und Spermatozyten, Anti-MYBL1 für Spermatozyten, Anti-ACE für Spermatiden und Spermatozoen und die beiden Marker Anti-H2AK5ac und - $\gamma$ H2A.X wurden für eine wiederkehrende Proteinexpression während der Spermatogenese ausgewählt. Dabei ließen sich vor allem in der spermatogonialen Entwicklung geringe Differenzen im zeitlichen Auftreten feststellen. Die Spermatogenese der verschiedenen Spezies ist demnach als weitestgehend aber nicht vollständig übereinstimmend zu beschreiben, was eine wichtige Erkenntnis für die Übertragbarkeit von Resultaten aus Tierexperimenten auf den Menschen darstellt. Daher sollte bei einer markergestützten Zellselektion bei in-vitro-Studien immer eine Überprüfung der speziesspezifischen Proteinexpression erfolgen.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war die Evaluation destinkter Phasen der Spermatogenese bei Patienten der Klassifikationen NSP (histologisch normale Spermatogenese), HYP (Hypospermatogenese) und SZA (Spermatozytenarrest). Für die Quantifizierung wurden die Marker Anti-OCT2, der eine Untergruppe der Spermatogonien Typ A detektiert, Anti-SAGE1, einem Marker differenzierender Spermatogonien und früher Spermatozyten (Mitose-Meiose-Übergang) und Anti-SMAD3, der pachytäne Spermatozyten kennzeichnet, verwendet. Es stellte sich heraus, dass HYP- und SZA-Patienten häufiger als NSP-Patienten eine reduzierte Anzahl von Spermatogonien und frühen Spermatozyten aufwiesen. Anhand der Cut-Offs für die entsprechenden Phasen der Keimzellentwicklung konnten die Patienten in verschiedene Untergruppen eingeteilt werden. Dies ermöglichte die individuelle Klassifizierung von Defiziten in der Spermatogenese. Da bei einigen der NSP- und HYP-Patienten trotz einer geringen Anzahl an Spermatogonien und/oder frühen Spermatozyten dennoch eine hohe Meiose-Effizienz (Anzahl pachytäner Spermatozyten) nachweisbar waren, können bei diesen Patienten Kompensationsmechanismen der frühen Spermatogenesedefekte angenommen werden. Weiterhin wurden bei SZA-Patienten sieben Mal häufiger reduzierte Zellzahlen differenzierender Spermatogonien und früher Spermatozyten als reduzierte OCT2-positive Spermatogonien quantifiziert. Daraus lässt sich folgern, dass vor allem prämeiotische Defekte die Meiose-Effizienz dieser Patienten beeinflussen.

Durch die neue markergestützte Klassifikationsmethode, die eine Ergänzung zur Arbeit von Hentrich et al. (2011) darstellt, können die prämeiotischen Verhältnisse analysiert und die Defizite der Patienten differenzierter definiert werden.

## Summary

In this study some immunohistochemical markers were selected from the database PubMed to compare different protein patterns in spermatogenesis of the species rat, mouse and human. Anti-SPOC1 was chosen for staining of spermatogonia, Anti-GILZ for spermatogonia and spermatocytes, Anti-MYBL1 for spermatocytes, Anti-ACE for spermatids and spermatozoa and H2AK5ac and  $\gamma$ H2A.X were chosen for recurring protein expression in spermatogenesis. The evaluation revealed little differences especially during maturation of spermatogonia. Hence, spermatogenesis of the species can be described as mostly but not completely congruent, which is an important insight for the transferability of results obtained from animal experiments to human. Therefore, there should always be a validation of protein expression when cell selection by markers is performed in *in vitro* studies.

Additionally, distinct phases of spermatogenesis could be evaluated in patients with the defined spermatogenic defects NSP (histologically intact spermatogenesis), HYP (hypospermatogenesis) and SZA (maturation arrest at the level of primary spermatocytes). For quantification OCT2 was chosen for a subgroup of type A spermatogonia, SAGE1 for differentiating spermatogonia and early spermatocytes (mitosis-meiosis transition) and SMAD3 for pachytene spermatocytes. It was revealed that HYP- and SZA-patients had more often reduced numbers of spermatogonia and early spermatocytes than NSP-patients. Patients could be categorized in different subgroups by the use of cut-offs for the distinct phases of spermatogenesis. This allowed an individual classification of defects in spermatogenesis. To be emphasized, even though some NSP- and HYP-patients had low numbers of spermatogonia and/or early spermatocytes, they showed a high efficiency of meiosis, indicating compensatory mechanisms in human spermatogenesis. Moreover, patients with maturation arrest at the level of primary spermatocytes had seven times more often reduced cell numbers in differentiating spermatogonia and early spermatocytes than reduced OCT2-positive spermatogonia. Thus, it can be suggested that especially premeiotic defects contribute to a low efficiency of meiosis in this patients.

Based on this new classification method by markers, which is an extension of the work of Hentrich et al. (2011), premeiotic conditions can be evaluated precisely and the defects of the patients are defined in more detail.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

A <sub>1</sub> - A <sub>4</sub>	Spermatogonien Typ A <sub>1</sub> -A <sub>4</sub>
A <sub>al</sub>	Spermatogonie(n) Typ A <sub>aligned</sub>
ACE	angiotensin I-converting enzyme
A <sub>dark</sub>	Spermatogonie(n) Typ A <sub>dark</sub>
AP	alkalische Phosphatase
A <sub>pale</sub>	Spermatogonie(n) Typ A <sub>pale</sub>
A <sub>pr</sub>	Spermatogonie(n) Typ A <sub>paired</sub>
Aqua dest.	destilliertes Wasser
A <sub>s</sub>	Spermatogonie(n) Typ A <sub>single</sub>
B	Spermatogonie(n) Typ B
Bg	Blutgefäß(e)
Bm	Basalmembran
BSA	bovines Serumalbumin, Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
DAB	Diaminobenzidin
Di	Diakinese
Diff. Spg	Differenzierende Spermatogonien
di-Spc	diplotäne(r) Spermatozyt(en)
DMRT1	doublesex and Mab-3 related transcription factor 1
DNA	desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbrüche
EGR4	early growth response protein 4
el. Spd	elongierte(r) Spermatid(en)
et al.	et alii / et aliae, und andere
g	Gramm
γH2A.X	phosphoryliertes Histon H2A.X
GILZ	glucocorticoid-induced leucine zipper
G-Phasen	Gap-Phasen, Lücke-Phasen
H2AK5ac	an Lysin 5 acetylierte Histon H2A
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H3K14ac	an Lysin 14 acetyliertes Histon H3
H3Ser28	an Serin 28 phosphoryliertes Histon H3
HRP	Horseradish Peroxidase, Meerrettichperoxidase
HYP	Hypospermatogenese

ICSI	intrazytoplasmatische Spermieninjektion
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
In	Typ Intermediär Spermatogonie(n)
JARID1B	Lysine-specific demethylase 5B, histone demethylase JARID1B
Ki-67	Antigen Ki-67, Proliferationsmarker
l	Liter
LR <sup>+</sup>	positive Likelihood-Ratio
l-Spc	leptotäne(r) Spermatozyt(en)
LZ	Leydig-Zelle(n)
m-	Milli-
M	molar
m2°m	sekundärer Spermatozyt
MEIG1	meiosis expressed gene 1
μ-	Mikro-
Min.	Minute(n)
M-Phase	Mitose-Phase
MSCI	meiotic sex chromosome inactivation
MYBL1	myeloblastosis oncogene-like 1, A-MYB
Myo	Myofibroblast(en)
n	Anzahl
NCOA1	nuclear receptor coactivator 1
ns	nicht signifikant
NSP	normale Spermatogenese
o.g.	oben genannt
OCT2	octamer binding protein 2, POU2F2
OCT4	octamer binding transcription factor 4, OCT3, POU5F1
PBS	phosphate-buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pl-Spc	(prä-)leptotäne(r) Spermatozyt(en)
PLZF	Promyelocytic leukemia zinc finger
p-Spc	pachytäne(r) Spermatozyt(en)
PubMed	englischsprachige textbasierte biomedizinische Meta-Datenbank
p-Wert	Signifikanzwert
rd. Spd	runde(r) Spermatid(en)
ROC	Receiver-Operating-Characteristics



Rs	Residualkörperchen
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
SAGE1	sarcoma antigen 1
SALL4	sal-like protein 4
SEM	standard error of the mean, Standardfehler
Sens.	Sensitivität
SMAD3	SMAD-Signalprotein 3
SMAD6	SMAD-Signalprotein 6
s.o.	siehe oben
sog.	sogenannten
SOHLH2	spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 2
Spc I bzw. II	primäre(r) und sekundäre(r) Spermatozyt(en)
Spez.	Spezifität
S-Phase	Synthese-Phase
SPOC1	survival time-associated PHD finger protein in ovarian cancer; PHF13
Spz	Spermatozoon / Spermatozoen
SSC	spermatogonial stem cell(s), Spermatogoniale Stammzelle(n)
SSX2-4	synovial sarcoma, X breakpoint 2-4
Std.	Stunde(n)
SYCP3	synaptonemal complex protein 3
Sz	Sertoli-Zelle
SZA	Spermatozytenarrest
TESE	testicular spermatozoa extraction, testikuläre Spermienextraktion
TGF $\beta$	transforming growth factor beta type, transformierender Wachstumsfaktor Typ Beta
TIF2	transcriptional intermediary factor 2
Tj	tight junction
TSPY	testis specific protein Y-encoded
u.a.	unter anderem
Undiff. Spg	Undifferenzierte Spermatogonien
UTF1	undifferentiated embryonic cell transcription factor 1
vs.	versus
Wdh.	Wiederholung(en)
z.B.	zum Beispiel
z-Spc	zygotäne(r) Spermatozyt(en)

## 7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Ausschnitt aus dem Keimepithel	2
Abbildung 1.2:	Darstellung der meiotischen ersten und zweiten Reifeteilung.	5
Abbildung 1.3:	Schematische Darstellung der Spermatogonientypen und eines primären Spermatozyten des Menschen	8
Abbildung 1.4:	Schematische Darstellung der Spermatogonientypen und eines Spermatozyten bei Ratten und Mäusen	8
Abbildung 1.5:	Spermatogenesestadien beim Mann	10
Abbildung 1.6:	Spermatogenesestadien bei der Ratte	11
Abbildung 1.7:	Spermatogenesestadien bei der Maus	11
Abbildung 1.8:	Modell einer Stammzellnische beim Nagetierhoden	12
Abbildung 2.1:	Zweischrittige Polymermethode mit dem EnVisionTM+ System (Dako) bzw. dem N-Histofine Simple Stain MAX PO-System (Medac)	23
Abbildung 2.2:	Darstellung des Grenzbereichs im Auszählverfahren	26
Abbildung 2.3:	Darstellung des Grenzbereichs im Auszählverfahren	27
Abbildung 3.1:	Nachweis von SPOC1-positiven Spermatogonien im adulten Hoden von Ratte (A, B), Maus (C, D) und Mensch (E)	31
Abbildung 3.2:	Nachweis von GILZ-positiven Zellen im adulten Hoden von Ratte (A, B), Maus (C, D) und Mensch (E)	33
Abbildung 3.3:	Nachweis der MYBL-Expression im adulten Hoden von Ratte (A, B), Maus (C, D) und Mensch (E)	35
Abbildung 3.4:	Nachweis der ACE-positiven Spermatiden und Spermatozoen im adulten Hoden von Ratte (A, B), Maus (C, D) und Mensch (E)	37
Abbildung 3.5:	Nachweis der H2AK5ac-positiven Zellen im adulten Hoden von der Ratte (A, B, C)	39
Abbildung 3.6:	Nachweis der H2AK5ac-positiven Zellen im adulten Hoden der Maus (A-C) und des Menschen (D)	40
Abbildung 3.7:	Nachweis der $\gamma$ H2A.X (Cell Signaling)-positiven Zellen im adulten Hoden der Ratte (A-D)	42
Abbildung 3.8:	Nachweis der $\gamma$ H2A.X (Cell Signaling)-positiven Zellen im adulten Hoden der Maus (A-D)	43

Abbildung 3.9: Nachweis der $\gamma$ H2A.X (Cell Signaling)-positiven Zellen im adulten Hoden des Menschen (A) und $\gamma$ H2A.X (Millipore) im humanen Hodengewebe (B)	44
Abbildung 3.10: Expressionsbereiche der verschiedenen Proteine in der Spermatogenese	46
Abbildung 3.11: Darstellung der OCT2-Expression in Hodengewebe der Patienten NSP (A), HYP (B) und SZA (C)	48
Abbildung 3.12: Darstellung der SAGE1-Expression in Hodengewebe der Patienten NSP (A), HYP (B) und SZA (C)	49
Abbildung 3.13: Darstellung der SMAD3-Expression in Hodengewebe der Patienten NSP (A), HYP (B) und SZA (C)	51
Abbildung 3.14: Mittelwerte der OCT2-positiven frühen Spermatogonien pro Tubulusquerschnitt $\pm$ SEM von 30 Patienten pro Gruppe	52
Abbildung 3.15: Mittelwerte der SAGE1-positiven Spermatogonien und frühen Spermatozyten pro Tubulusquerschnitt $\pm$ SEM von 30 Patienten pro Gruppe	53
Abbildung 3.16: Mittelwerte der SMAD3-positiven pachytänen Spermatozyten pro Tubulusquerschnitt $\pm$ SEM von 30 Patienten pro Gruppe	53
Abbildung 3.17: Darstellung der Spermatogenesestadien des humanen Hodens bis zu pachytänen Spermatozyten im zeitlichen Verlauf	57
Abbildung 3.18: Gruppierung der Spermatogenesedefizite zur Patientenklassifikation	58

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1.1: Modifizierte Darstellung des Scores nach Bergmann & Kliesch (1998, 2009)	14
Tabelle 2.1: Protokoll des Paraffineinbettungsautomaten	17
Tabelle 2.2: Primärantikörper für die Expressionsmusteranalyse	18
Tabelle 2.3: Primärantikörper für die Serienuntersuchung am humanen Gewebe	19
Tabelle 2.4: Im Rahmen des Screenings getestete Primärantikörper	20
Tabelle 2.5: Protokoll für die Entparaffinierung und Rehydrierung des Gewebes	23
Tabelle 2.6: Interpretation der LR+, modifiziert aus Jaeschke et al. (1994)	28
Tabelle 3.1: Auswertung der Reduktion von Spermatogonien und Spermatozyten bei NSP, HYP und SZA	55
Tabelle 3.2: Darstellung der Grenzwerte mit den zugehörigen Spezifitäten und Sensitivitäten sowie LR+-Werte für OCT2, SAGE1, SMAD3	56

## 8 Literaturverzeichnis

- Aponte PM, van Bragt MP, de Rooi DG, van Pelt AM (2005). Spermatogonial stem cells: characteristics and experimental possibilities. *APMIS* 113:727–742.
- Atanassova N, Lakova E, Bratchkova Y, Krasteva G, Donchev M (2009). Expression of testicular angiotensin-converting enzyme in adult spontaneously hypertensive rats. *Folia Histochem. Cytobiol.* 47:117–122.
- Bar-Shira Maymon B, Yogev L, Yavetz H, Lifschitz-Mercer B, Schreiber L, Kleiman SE, Botchan A, Hauser R, Paz G (2003). Spermatogonial proliferation patterns in men with azoospermia of different etiologies. *Fertil. Steril.* 80:1175–1180.
- Bergmann M (2005). Spermatogenesis – physiology and pathophysiology. *Urologe A.* 44:1131–1138.
- Bergmann M, Kliesch S (1998) Hodenbiopsie. I: Andrologie. Krause W, Weidner W (eds). Enke-Verlag, Stuttgart. S. 66–71.
- Bergmann M, Kliesch S (2009) Biopsie und Histologie der Hoden. In: Andrologie. Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S (eds). Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg. S. 162–172.
- Blanco-Rodríguez J (2009). gammaH2AX marks the main events of the spermatogenic process. *Microsc. Res. Tech.* 72:823–832.
- Blanco-Rodríguez J (2012). Programmed phosphorylation of histone H2AX precedes a phase of DNA double-strand break-independent synapsis in mouse meiosis. *Reproduction* 144:699–712.
- Bolcun-Filas E, Bannister LA, Barash A, Schimenti KJ, Hartford SA, Eppig JJ, Handel MA, Shen L, Schimenti JC (2011). A-MYB (MYBL1) transcription factor is a master regulator of male meiosis. *Development* 138:3319–3330.
- Bördlein A, Scherthan H, Nelkenbrecher C, Molter T, Bösl MR, Dippold C, Birke K, Kinkley S, Staeger H, Will H, Winterpacht A (2011). SPOC1 (PHF13) is required for spermatogonial stem cell differentiation and sustained spermatogenesis. *J. Cell. Sci.* 124:3137–3148.
- Borgers M, Wolter M, Hentrich A, Bergmann M, Stammeler A, Konrad L (2014). Role of compensatory meiosis mechanisms in human spermatogenesis. *Reproduction* 148:315–320.
- Brown PW, Judis L, Chan ER, Schwartz S, Seftel A, Thomas A, Hassold TJ (2005). Meiotic synapsis proceeds from a limited number of subtelomeric sites in the human male. *Am. J. Hum. Genet.* 77:556–566.
- Bruscoli S, Velardi E, Di Sante M, Bereshchenko O, Venanzi A, Coppo M, Berno V, Mameli MG, Colella R, Cavaliere A, Riccardi C (2012). Long glucocorticoid-induced

- leucine zipper (L-GILZ) protein interacts with ras protein pathway and contributes to spermatogenesis control. *J. Biol. Chem.* 287:1242–1251.
- Buaas FW, Kirsh AL, Sharma M, McLean DJ, Morris JL, Griswold MD, de Rooij DG, Braun RE (2004). Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat. Genet.* 36:647–652.
- Cabrero J, Palomino-Morales RJ, Camacho JP (2007). The DNA-repair Ku70 protein is located in the nucleus and tail of elongating spermatids in grasshoppers. *Chromosome Res.* 15:1093–1100.
- Caires K, Broady J, McLean D (2010). Maintaining the male germline: regulation of spermatogonial stem cells. *J. Endocrinol.* 205:133–145.
- Cerilli LA, Kuang W, Rogers D (2010). A practical approach to testicular biopsy interpretation for male infertility. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 134:1197–1204.
- Chen YT, Chiu R, Lee P, Beneck D, Jin B, Old LJ (2011). Chromosome X-encoded cancer/testis antigens show distinctive expression patterns in developing gonads and in testicular seminoma. *Hum. Reprod.* 26:3232–3243.
- Chiarini-Garcia H, Russell LD (2001). High-resolution light microscopic characterization of mouse spermatogonia. *Biol. Reprod.* 65:1170–1178.
- Chiarini-Garcia H, Hornick JR, Griswold MD, Russell LD (2001). Distribution of type A spermatogonia in the mouse is not random. *Biol. Reprod.* 65:1179–1185.
- Chiarini-Garcia H, Raymer AM, Russell LD (2003). Non-random distribution of spermatogonia in rats: evidence of niches in the seminiferous tubules. *Reproduction* 126:669–680.
- Clermont Y (1963). The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am. J. Anat.* 112:35–51.
- Clermont Y (1972). Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol. Reviews* 52:198–236.
- Dadoune JP (2007). New insights into male gametogenesis: what about the spermatogonial stem cell niche? *Folia Histochem. Cytobiol.* 45:141–147.
- de Rooij DG (1998). Stem cells in the testis. *Int. J. Exp. Pathol.* 79:67–80.
- de Rooij DG (2009). The spermatogonial stem cell niche. *Microsc. Res. Tech.* 72:580–585.
- de Rooij DG, Grootegoed JA (1998). Spermatogonial stem cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10:694–701.
- de Rooij DG, Russell LD (2000). All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J. Androl.* 21:776–798.
- de Rooij DG, Griswold MD (2012). Questions about spermatogonia posed and answered since 2000. *J. Androl.* 33:1085–1095.



- Derynck R, Zhang YE (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425:577–584.
- de Vries M, Vosters S, Merks G, D'Hauwers K, Wansink DG, Ramos L, de Boer P (2012). Human male meiotic sex chromosome inactivation. *PLoS ONE* 7:e31485.
- Dohle GR, Elzanaty S, van Casteren NJ (2012). Testicular biopsy: clinical practice and interpretation. *Asian J. Androl.* 14:88–93.
- Drenckhahn D (2008). Zellenlehre. In: Anatomie (Band 1). Benninghoff A, Drenckhahn D (eds). Urban & Fischer, München. S. 10-91.
- Dym M, Kokkinaki M, He Z (2009). Spermatogonial stem cells: mouse and human comparisons. *Birth Defects Res. C Embryo Today* 87:27–34.
- Eguizabal C, Montserrat N, Vassena R, Barragan M, Garreta E, Garcia-Quevedo L, Vidal F, Giorgetti A, Veiga A, Izpisua Belmonte JC (2011). Complete meiosis from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 29:1186–1195.
- Ehmcke J, Wistuba J, Schlatt S (2006). Spermatogonial stem cells: questions, models and perspectives. *Hum. Reprod. Update* 12:275–282.
- Encinas G, Zogbi C, Stumpp T (2012). Detection of four germ cell markers in rats during testis morphogenesis: differences and similarities with mice. *Cells Tissues Organs* 195:443–455.
- Faure AK, Pivot-Pajot C, Kerjean A, Hazzouri M, Pelletier R, Péoc'h M, Sèle B, Khochbin S, Rousseaux S (2003). Misregulation of histone acetylation in Sertoli cell-only syndrome and testicular cancer. *Mol. Hum. Reprod.* 9:757–763.
- Feng XH, Derynck R (1997). A kinase subdomain of transforming growth factor-beta (TGF-beta) type I receptor determines the TGF-beta intracellular signaling specificity. *EMBO J.* 16:3912–3923.
- Ferguson KA, Wong EC, Chow V, Nigro M, Ma S (2007). Abnormal meiotic recombination in infertile men and its association with sperm aneuploidy. *Hum. Mol. Genet.* 16:2870–2879.
- Fernandez-Capetillo O, Mahadevaiah SK, Celeste A, Romanienko PJ, Camerini-Otero RD, Bonner WM, Manova K, Burgoyne P, Nussenzweig A (2003). H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Dev. Cell* 4:497–508.
- Gonsalves J, Sun F, Schlegel PN, Turek PJ, Hopps CV, Greene C, Martin RH, Pera RA (2004). Defective recombination in infertile men. *Hum. Mol. Genet.* 13:2875–2883.
- Grimes SR Jr, Henderson N (1984). Hyperacetylation of histone H4 in rat testis spermatids. *Exp. Cell Res.* 152:91–97.
- Grunstein M (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 389:349–352.

- Hamer G, Roepers-Gajadien HL, van Duyn-Goedhart A, Gademan IS, Kal HB, van Buul PP, de Rooij DG (2003). DNA double-strand breaks and gamma-H2AX signaling in the testis. *Biol. Reprod.* 68:628–634.
- Handel MA (2004). The XY body: a specialized meiotic chromatin domain. *Exp. Cell Res.* 296:57–63.
- Hazzouri M, Pivot-Pajot C, Faure AK, Usson Y, Pelletier R, Sèle B, Khochbin S, Rousseaux S (2000). Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone deacetylases. *Eur. J. Cell Biol.* 79:950–960.
- Hentrich A, Wolter M, Szardening-Kirchner C, Lüers GH, Bergmann M, Kliesch S, Konrad L (2011). Reduced numbers of Sertoli, germ, and spermatogonial stem cells in impaired spermatogenesis. *Mod. Pathol.* 24:1380–1389.
- Hermann BP, Sukhwani M, Simorangkir DR, Chu T, Plant TM, Orwig KE (2009). Molecular dissection of the male germ cell lineage identifies putative spermatogonial stem cells in rhesus macaques. *Hum. Reprod.* 24:1704–1716.
- Hermann BP, Sukhwani M, Hansel MC, Orwig KE (2010). Spermatogonial stem cells in higher primates: are there differences from those in rodents? *Reproduction* 139:479–493.
- Holstein AF (1999). Spermatogenese beim Menschen: Grundlagenforschung und Klinik. Referat auf der 94. Versammlung der Anatomischen Gesellschaft in Hamburg, 26.-29. März 1999. *Ann Anat* (1999) 181: 427-436
- Holstein AF (2008). Männliche Geschlechtsorgane. In: Anatomie (Band 1). Benninghoff A, Drenckhahn D (eds). Urban & Fischer, München. S. 799-837.
- Holstein AF, Schulze W, Davidoff M (2003). Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1:107.
- Horvath GC, Kistler MK, Kistler WS (2009). RFX2 is a candidate downstream amplifier of A-MYB regulation in mouse spermatogenesis. *BMC Dev. Biol.* 9:63.
- Huckins C (1971). The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation. *Anat. Rec.* 169:533–557.
- Huckins C (1978). The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. *Anat. Rec.* 190:905–926.
- Inagaki A, Schoenmakers S, Baarends WM (2010). DNA double strand break repair, chromosome synapsis and transcriptional silencing in meiosis. *Epigenetics* 5:255–266.
- Itman C, Wong C, Hunyadi B, Ernst M, Jans DA, Loveland KL (2011). Smad3 dosage determines androgen responsiveness and sets the pace of postnatal testis development. *Endocrinology* 152:2076–2089.

- Jaeschke R, Guyatt GH, Sackett DL (1994). Users' guides to the medical literature. III. How to use an article about a diagnostic test. B. What are the results and will they help me in caring for my patients? The Evidence-Based Medicine Working Group. *JAMA* 271:703–707.
- Jamsai D, Grealy A, Stahl PJ, Schlegel PN, McLachlan RI, Morand E, O'Bryan MK (2013). Genetic variants in the human glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) gene in fertile and infertile men. *Andrology* 1:451–455.
- Johnsen SG (1970). Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones* 1:2–25.
- Johnson L, Petty CS, Neaves WB (1983). Further quantification of human spermatogenesis: germ cell loss during postprophase of meiosis and its relationship to daily sperm production. *Biol. Reprod.* 29:207–215.
- Johnson L, Nguyen HB, Petty CS, Neaves WB (1987). Quantification of human spermatogenesis: germ cell degeneration during spermatocytogenesis and meiosis in testes from younger and older adult men. *Biol. Reprod.* 37:739–747.
- Keeney S, Giroux CN, Kleckner N (1997). Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell* 88:375–384.
- Kido T, Lau YF (2006). The rat Tspy is preferentially expressed in elongated spermatids and interacts with the core histones. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 350:56–67.
- Kinkley S, Staage H, Mohrmann G, Rohaly G, Schaub T, Kremmer E, Winterpacht A, Will H (2009). SPOC1: a novel PHD-containing protein modulating chromatin structure and mitotic chromosome condensation. *J. Cell. Sci.* 122:2946–2956.
- Knobil E, Neill JD (2006). *Knobil and Neill's physiology of reproduction*. Elsevier, Amsterdam.
- Kolasa A, Misiakiewicz K, Marchlewicz M, Wiszniewska B (2012). The generation of spermatogonial stem cells and spermatogonia in mammals. *Reprod. Biol.* 12:5–23.
- Kristensen DM, Nielsen JE, Skakkebaek NE, Graem N, Jacobsen GK, Rajpert-De Meyts E, Leffers H (2008). Presumed pluripotency markers UTF-1 and REX-1 are expressed in human adult testes and germ cell neoplasms. *Hum. Reprod.* 23:775–782.
- Kuo MH, Allis CD (1998). Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays* 20:615–626.
- Langford KG, Zhou Y, Russell LD, Wilcox JN, Bernstein KE (1993). Regulated expression of testis angiotensin-converting enzyme during spermatogenesis in mice. *Biol. Reprod.* 48:1210–1218.
- Leblond CP, Clermont Y (1952). Definition of the stages of the cycle of the seminiferous

- epithelium in the rat. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 55:548–573.
- Li L, Xie T (2005). Stem cell niche: structure and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21:605–631.
- Lim J, Goriely A, Turner GD, Ewen KA, Jacobsen GK, Graem N, Wilkie AO, Rajpert-De Meyts E (2011). OCT2, SSX and SAGE1 reveal the phenotypic heterogeneity of spermatocytic seminoma reflecting distinct subpopulations of spermatogonia. *J. Pathol.* 224:473–483.
- Looijenga LH (2011). Spermatocytic seminoma: toward further understanding of pathogenesis. *J. Pathol.* 224:431–433.
- Lüllmann-Rauch R (2006). *Taschenlehrbuch Histologie*. Thieme, Stuttgart. S.68-90; 461-480.
- Mahadevaiah SK, Turner JM, Baudat F, Rogakou EP, de Boer P, Blanco-Rodríguez J, Jasin M, Keeney S, Bonner WM, Burgoyne PS (2001). Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat. Genet.* 27:271–276.
- Matsuda T, Hiura Y, Muguruma K, Okuno H, Horii Y, Yoshida O (1996). Quantitative analysis of testicular histology in patients with vas deferens obstruction caused by childhood inguinal herniorrhaphy: comparison to vasectomized men. *J. Urol.* 155:564–567.
- Meistrich ML, Trostle-Weige PK, Lin R, Bhatnagar YM, Allis CD (1992). Highly acetylated H4 is associated with histone displacement in rat spermatids. *Mol. Reprod. Dev.* 31:170–181.
- Mitchell RT, Cowan G, Morris KD, Anderson RA, Fraser HM, Mckenzie KJ, Wallace WH, Kelnar CJ, Saunders PT, Sharpe RM (2008). Germ cell differentiation in the marmoset (*Callithrix jacchus*) during fetal and neonatal life closely parallels that in the human. *Hum. Reprod.* 23:2755–2765.
- Mohrmann G, Hengstler JG, Hofmann TG, Ende SU, Lee B, Stelzer C, Zabel B, Brieger J, Hasenclever D, Tanner B, Sagemueller J, Sehouli J, Will H, Winterpacht A (2005). SPOC1, a novel PHD-finger protein: association with residual disease and survival in ovarian cancer. *Int. J. Cancer* 116:547–554.
- Nakagawa T, Nabeshima Y, Yoshida S (2007). Functional identification of the actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis. *Dev. Cell* 12:195–206.
- Nieschlag E (2009). Aufgaben und Ziele der Andrologie. In: *Andrologie*. Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S (eds). Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg. S. 4-12.
- Oakberg EF (1956). A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *Am. J. Anat.* 99:391–413.
- Oakberg EF (1971). Spermatogonial stem-cell renewal in the mouse. *Anat. Rec.*

169:515–531.

- Oatley JM, Brinster RL (2008). Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 24:263–286.
- Oh IH, Reddy EP (1999). The myb gene family in cell growth, differentiation and apoptosis. *Oncogene* 18:3017–3033.
- Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M, Bonner WM (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr. Biol.* 10:886–895.
- Pauls K, Metzger R, Steger K, Klonisch T, Danilov S, Franke FE (2003). Isoforms of angiotensin I-converting enzyme in the development and differentiation of human testis and epididymis. *Andrologia* 35:32–43.
- Phillips BT, Gassei K, Orwig KE (2010). Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 365:1663–1678.
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* 273:5858–5868.
- Roig I, Liebe B, Egozcue J, Cabero L, Garcia M, Scherthan H (2004). Female-specific features of recombinational double-stranded DNA repair in relation to synapsis and telomere dynamics in human oocytes. *Chromosoma* 113:22–33.
- Romero Y, Vuandaba M, Suarez P, Grey C, Calvel P, Conne B, Pearce D, de Massy B, Hummler E, Nef S (2012). The Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) is essential for spermatogonial survival and spermatogenesis. *Sex. Dev.* 6:169–177.
- Roosen-Runge EC, Marberger E, Nelson WO (1957). Quantitative investigations on human testicular biopsies. II. Infertility and other conditions. *Fertil. Steril.* 8:203–219.
- Rowley MJ, Heller CG (1971). Quantitation of the cells of the seminiferous epithelium of the human testis employing the sertoli cell as a constant. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 115:461–472.
- Royo H, Polikiewicz G, Mahadevaiah SK, Prosser H, Mitchell M, Bradley A, de Rooij DG, Burgoyne PS, Turner JM (2010). Evidence that meiotic sex chromosome inactivation is essential for male fertility. *Curr. Biol.* 20:2117–2123.
- Russell LD, Ettlin RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED (1990). Histological and histopathological evaluation of the testis. Cache River Press, Clearwater. S. 10-20.
- Shetty G, Meistrich ML (2007). The missing niche for spermatogonial stem cells: do blood vessels point the way? *Cell Stem Cell* 1:361–363.
- Sibony M, Segretain D, Gasc JM (1994). Angiotensin-converting enzyme in murine testis: step-specific expression of the germinal isoform during spermiogenesis. *Biol. Reprod.* 50:1015–1026.

- Silber SJ, Nagy Z, Devroey P, Tournaye H, Van Steirteghem AC (1997). Distribution of spermatogenesis in the testicles of azoospermic men: the presence or absence of spermatids in the testes of men with germinal failure. *Hum. Reprod.* 12:2422–2428.
- Skakkebaek NE, Hultén M, Jacobsen P, Mikkelsen M (1973). Quantification of human seminiferous epithelium. II. Histological studies in eight 47,XXX men. *J. Reprod. Fertil.* 32:391–401.
- Sonnack V, Failing K, Bergmann M, Steger K (2002). Expression of hyperacetylated histone H4 during normal and impaired human spermatogenesis. *Andrologia* 34:384–390.
- Steger K, Aleithe I, Behre H, Bergmann M (1998). The proliferation of spermatogonia in normal and pathological human seminiferous epithelium: an immunohistochemical study using monoclonal antibodies against Ki-67 protein and proliferating cell nuclear antigen. *Mol. Hum. Reprod.* 4:227–233.
- Steger K, Rey R, Louis F, Kliesch S, Behre HM, Nieschlag E, Hoepffner W, Bailey D, Marks A, Bergmann M (1999). Reversion of the differentiated phenotype and maturation block in Sertoli cells in pathological human testis. *Hum. Reprod.* 14:136–143.
- Suarez PE, Rodriguez EG, Soundararajan R, Méritat AM, Stehle JC, Rotman S, Roger T, Voirol MJ, Wang J, Gross O, Pétrilli V, Nadra K, Wilson A, Beermann F, Pralong FP, Maillard M, Pearce D, Chrast R, Rossier BC, Hummler E (2012). The glucocorticoid-induced leucine zipper (gilz/Tsc22d3-2) gene locus plays a crucial role in male fertility. *Mol. Endocrinol.* 26:1000–1013.
- Takagi S, Itoh N, Kimura M, Sasao T, Tsukamoto T (2001). Spermatogonial proliferation and apoptosis in hypospermatogenesis associated with nonobstructive azoospermia. *Fertil. Steril.* 76:901–907.
- Takahashi T, Nakagoshi H, Sarai A, Nomura N, Yamamoto T, Ishii S (1995). Human A-myb gene encodes a transcriptional activator containing the negative regulatory domains. *FEBS Lett.* 358:89–96.
- Tang H, Goldberg E (2012). A-MYB (MYBL1) stimulates murine testis-specific Ldhc expression via the cAMP-responsive element (CRE) site. *Biol. Reprod.* 86:30.
- Toscani A, Mettus RV, Coupland R, Simpkins H, Litvin J, Orth J, Hatton KS, Reddy EP (1997). Arrest of spermatogenesis and defective breast development in mice lacking A-myb. *Nature* 386:713–717.
- Turner JM (2007). Meiotic sex chromosome inactivation. *Development* 134:1823–1831.
- Vogl AW, Pfeiffer DC, Mulholland D, Kimel G, Guttman J (2000). Unique and multifunctional adhesion junctions in the testis: ectoplasmic specializations. *Arch. Histol. Cytol.* 63:1–15.
- von Kopylow K, Staeger H, Schulze W, Will H, Kirchhoff C (2012a). Fibroblast growth



- factor receptor 3 is highly expressed in rarely dividing human type A spermatogonia. *Histochem. Cell Biol.* 138:759–772.
- von Kopylow K, Staeger H, Spiess AN, Schulze W, Will H, Primig M, Kirchhoff C (2012b). Differential marker protein expression specifies rarefaction zone-containing human Adark spermatogonia. *Reproduction* 143:45–57.
- Weedin JW, Bennett RC, Fenig DM, Lamb DJ, Lipshultz LI (2011). Early versus late maturation arrest: reproductive outcomes of testicular failure. *J. Urol.* 186:621–626.
- Weinbauer GF, Luetjens CM, Simoni M, Nieschlag E (2009). Physiologie der Hodenfunktion. In: *Andrologie*. Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S (eds). Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg. S.15–61.
- Xu J, Beyer AR, Walker WH, McGee EA (2003). Developmental and stage-specific expression of Smad2 and Smad3 in rat testis. *J. Androl.* 24:192–200.
- Yoshida S, Sukeno M, Nabeshima Y (2007). A vasculature-associated niche for undifferentiated spermatogonia in the mouse testis. *Science* 317:1722–1726.
- Zhao S, Shetty J, Hou L, Delcher A, Zhu B, Osoegawa K, de Jong P, Niernan WC, Strausberg RL, Fraser CM (2004). Human, mouse, and rat genome large-scale rearrangements: stability versus speciation. *Genome Res.* 14:1851–1860.
- Zukerman Z, Rodriguez-Rigau LJ, Weiss DB, Chowdhury AK, Smith KD, Steinberger E (1978). Quantitative analysis of the seminiferous epithelium in human testicular biopsies, and the relation of spermatogenesis to sperm density. *Fertil. Steril.* 30:448–455

## 9 Publikationsverzeichnis

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

Borgers M, Wolter M, Hentrich A, Bergmann M, Stammeler A, Konrad L (2014). Role of compensatory meiosis mechanisms in human spermatogenesis. *Reproduction* 148:315–320.

## 10 Ehrenwörtliche Erklärung

### Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## 11 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bedanken bei

meinem Doktorvater, Herrn PD. Dr. Lutz Konrad, für die Auswahl des Themas, die nette und stetig geduldige Unterstützung sowie die gute wissenschaftliche Betreuung,

Herrn Prof. Dr. Martin Bergmann und der gesamten Arbeitsgruppe für die Bereitstellung der Hodenbiopsien aus dem Giessener Hodenbiopsie-Register,

bei Frau Cornelia Hof für die fachkundige Einarbeitung in die Immunhistochemie sowie den weiteren Mitarbeitern Herrn Dr. Mecha Ezekiel, Frau Dr. Angelika Stammeler, Frau Dorina Zoltan und Frau Carina Lepper für die allzeit freundliche Zusammenarbeit,

Herrn Prof. Dr. Hans Will und Dr. Ruurd Torensma für das Überlassen der Antikörper SPOC1 und SSX2-4,

bei meinen Freunden Anna Hentrich, Benjamin Lüftner, Judith Gronbach und Martin Wolter für die ergebnisreiche Zeit im Labor und die gegenseitige Bestätigung,

bei Herrn Marcel Oelschläger für die Einarbeitung in die Programme zur Erstellung und Bearbeitung der Grafiken und Abbildungen,

bei Herrn Kevin Gudd für das Lesen von Teilen dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie für das Gegenlesen dieser Arbeit, für Hilfestellungen beim Layout und für die konstante mentale Unterstützung.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
[redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)  
[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

ISBN: 978-3-8359-6340-5



9 783835 196340 5